

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* E *Zingiber officinale* FRENTE A *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE FRANGO**

Andréa Wolf Diemer

Lajeado, fevereiro de 2016

Andréa Wolf Diemer

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE *Rosmarinus officinalis* E *Zingiber officinale* FRENTE A *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* EM CARNE MECANICAMENTE SEPARADA DE FRANGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr Eduardo M. Ethur

Lajeado, fevereiro de 2016

## RESUMO

A indústria de produtos cárneos, necessita produtos que possuem uma demanda alta de vendas, porém, o consumidor, em busca de uma vida mais saudável está exigindo produtos com praticidade, qualidade, segurança e que estes sejam nutritivos. Um dos ingredientes utilizados para a fabricação de produtos a base de carne é o nitrito. Este melhora a coloração, realça o sabor, impede a oxidação lipídica e é um importante agente bactericida na indústria de alimentos. Porém, o nitrito, em concentrações elevadas pode ser carcinogênico. Levando isto em consideração o objetivo deste trabalho é avaliar a ação antimicrobiana de extrato aquoso e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e gengibre (*Zingiber officinale*) frente a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em carne mecanicamente separada de frango (CMS). Realizou-se as análises da CIM e CBM sendo que para *E. coli* utilizando o extrato aquoso de alecrim verificou-se, uma CIM de 5,0 mg/mL e CBM >20 mg/mL, enquanto o extrato aquoso de gengibre uma CIM de 20 mg/mL e CBM >20 mg/mL. Para o óleo essencial de alecrim constatou-se uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL, enquanto o óleo de gengibre uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 5,0 mg/mL. Para *S. aureus* utilizando o extrato aquoso de alecrim, obteve-se uma CIM e CBM de 5,0 mg/mL, enquanto o extrato aquoso de gengibre uma CIM e CBM de 20 mg/mL. Para o óleo essencial de alecrim constatou-se uma CIM de 0,625 mg/mL e CBM de 1,25 mg/mL, enquanto o óleo de gengibre uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL. A partir destes resultados pode-se dizer que os mesmos demonstram-se promissores em relação a ação bactericida e bacteriostática. Em posse dos resultados da CIM e CBM, descartou-se o uso dos extratos aquosos, em função da baixa atividade detectada na CIM e CBM, então seguiu-se os experimentos somente com os óleos essenciais, em seguida, realizou-se as análises de contagem de colônias (UFC) das amostras. Para estas análises verificou-se que o óleo de alecrim e gengibre frente as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), não apresentaram efeito bacteriostático e nem bactericida. Diante de todos os resultados constatou-se que a CIM e CBM não podem ser utilizados como parâmetro microbiológico para matrizes cárneas, pois o comportamento bactericida e bacteriostáticos não se equivaleram, isso para as condições dos experimentos realizados nesta pesquisa.

**Palavras chaves:** Microrganismos patogênicos. Intoxicação alimentar. Atividade antimicrobiana. Alecrim. Gengibre

## ABSTRACT

The industry of meat products, you need products that have a high demand for sales, however, consumers in search of a healthier life is demanding products with convenience, quality, safety and they are nutritious. One of the ingredients used for the manufacture of meat products is nitrite. This improves the color, enhance flavor, prevent lipid oxidation and is an important bactericidal agent in the food industry. However, the nitrite in high concentrations may be carcinogenic. Taking this into account the objective of this study is to evaluate the antimicrobial activity of aqueous extract and essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and ginger (*Zingiber officinale*) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in mechanically deboned chicken meat (CMS). It was performed the analysis of MIC and MBC where in *E. coli* using the aqueous extract of rosemary was found a MIC of 5.0 mg/mL and MBC > 20 mg/mL, while the aqueous extract of ginger a 20 MIC mg/mL and MBC > 20 mg/mL. For rosemary essential oil found to be a MIC of 1.25 mg/mL and MBC of 2.5 mg/mL, where as the MIC one ginger oil 1.25 mg/mL and CBM 5.0 mg/mL. For *S. aureus* using the aqueous extract of rosemary, obtained an MIC and MBC of 5.0 mg/mL while the aqueous extract of ginger one MIC and MBC 20 mg/mL. For rosemary essential oil found to be a MIC of 0.625 mg/mL and MBC of 1.25 mg/mL, where as the MIC one ginger oil 1.25 mg/mL and MBC of 2.5 mg/mL. From these results it can be said that they show promise in relation to bactericidal and bacteriostatic action. In possession of the results of MIC and MBC, was discarded the use of aqueous extracts, due to the low activity detected in MIC and MBC, then the experiments followed only with essential oils, then was held the analyzes of colony counts (CFU) of the samples. For this analysis it was found that rosemary oil and ginger front bacteria *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), and showed no bacteriostatic or bactericidal effect. Before all the results it was found that the MIC and MBC can not be used as microbiological parameter to cárneas arrays, because the bactericidal and bacteriostatic behavior is not equaled, that for the conditions of the experiments in this study.

**Key words:** pathogenic microorganisms. Food poisoning. Antimicrobial activity. Rosemary. Ginger

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura foliar da planta do alecrim .....	20
Figura 2 - Planta e rizoma do gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> ) .....	21
Figura 3 - Estrutura química do 1,8 Cineol.....	24
Figura 4 - Estrutura química da cânfora .....	25
Figura 5 - Estrutura química do borneol.....	25
Figura 6 - Estrutura química do Alfa-terpineol.....	26
Figura 7 - Estrutura química do $\beta$ -felandreno.....	26
Figura 8 - Estrutura química do geranial e do neral .....	27
Figura 9 - Estrutura química do $\alpha$ -zingibereno .....	28
Figura 10 - Estrutura química do $\gamma$ -curcumeno .....	28
Figura 12 - Estrutura química do $\beta$ -bisaboleno .....	29
Figura 13 - Carne mecanicamente separada (CMS) de frango .....	31
Figura 14 - Aparelho de extração Clevenger modificado .....	39
Figura 15 - Placa de 96 poços para a confirmação da CIM .....	44
Figura 16 - Placa de Petri com Muller Hinton para confirmação da CBM .....	45
Figura 17 - Cromatograma do óleo essencial de alecrim.....	49
Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial de gengibre .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento do óleo essencial e do extrato aquoso de alecrim e gengibre .....	48
Tabela 2 - Componentes do óleo essencial de alecrim .....	50
Tabela 3 - Componentes do óleo de gengibre .....	52
Tabela 4 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>E. coli</i> do alecrim e do gengibre .....	53
Tabela 5 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente <i>Staphylococcus aureus</i> do alecrim e do gengibre .....	54
Tabela 6 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de alecrim frente a <i>E.coli</i> em (UFC).....	57
Tabela 7 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de gengibre frente a <i>E.coli</i> em (UFC).....	57
Tabela 8 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de alecrim frente ao <i>S. aureus</i> em (UFC) .....	58
Tabela 9 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de gengibre frente ao <i>S. aureus</i> em (UFC) .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
ATCC	American Type Culture Collection
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMS	Carne Mecanicamente Separada
CTPPA	Centro Tecnológico de Pesquisa e Produção de Alimentos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DV	Destilação a vapor
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food Agricultural Organization
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HD	Hidrodestilação
IK	Índice de retenção de Kovats
NCCLS	National Committee on Clinical Laboratory Standards
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RS	Rio Grande do Sul
SFE	Extração com Fluido Supercrítico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio

UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UV-VIS	Ultra Violeta- Visível
VRBA	Ágar bile vermelho violeta
WHO	World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Extratos vegetais .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Plantas condimentares.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Alecrim .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Gengibre .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Metabolismo vegetal.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Principais componentes dos óleos de alecrim e gengibre .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1</b>	<b>1,8 Cineol .....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Cânfora.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Borneol.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.4</b>	<b><math>\alpha</math>-terpineol .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.5</b>	<b><math>\beta</math>-felandreno .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Neral e Geranial.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.7</b>	<b><math>\gamma</math>-curcumeno e <math>\alpha</math>-zingibereno .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.8</b>	<b><math>\beta</math>-bisaboleno.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Utilização do óleo essencial pela indústria .....</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Carne Mecanicamente Separada (CMS).....</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Segurança alimentar e Contaminação .....</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Microrganismos patogênicos .....</b>	<b>34</b>
<b>2.6.1</b>	<b>Escherichia coli e sua contaminação .....</b>	<b>35</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Staphylococcus aureus e sua Contaminação.....</b>	<b>36</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Amostras .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Obtenção dos extratos .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Óleo essencial.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Extrato aquoso .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Processos de purificação e identificação.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Análise da composição química do óleo essencial .....</b>	<b>40</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Cromatografia gasosa e o Índice de Kovats .....</b>	<b>40</b>

3.4	Aspectos químicos e biológicos .....	41
3.4.1	Atividade antimicrobiana .....	41
3.4.2	Análises de contagem bacteriana da carne mecanicamente separada (CMS) contaminada adicionada de óleo essencial .....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	48
4.1	Rendimento dos extratos .....	48
4.2	Análise cromatográfica dos óleos essenciais de alecrim e gengibre ..	49
4.3	Atividade antimicrobiana.....	53
4.4	Resultados das análises de contagem bacteriana da carne mecanicamente separada (CMS) contaminada adicionada de óleo essencial .	55
5	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos, nas últimas décadas, estão enfrentando um grande desafio para atender as exigências legais para garantir a segurança alimentar, como também corresponder as expectativas dos consumidores em relação a preocupação com a saúde, pois muitos são conscientes dos possíveis efeitos dos aditivos sintéticos usados na conservação dos alimentos (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011). Aliados aos conceitos de produto natural e asséptico tem aumentado rapidamente. Estes produtos podem conter ingredientes naturais, sem conservantes artificiais, com isso não desencadeando alergias ou sensibilidades comuns que podem ocorrer em alguns consumidores em função do acréscimo de aditivos químicos artificiais na formulação de alimentos, principalmente de produtos cárneos (MARIUTTI; NOGUEIRA; BRAGAGNOLO, 2011).

Estima-se que a cada ano 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos ocorram apenas nos Estados Unidos, com 325.000 internações e 5.000 óbitos, levando a custos médicos e prejuízos envolvendo a produtividade, na faixa de US\$ 6,6 a 37,1 bilhões (JAYASENA e JO, 2013). No que se refere a carnes e seus derivados, vários microrganismos patogênicos incluindo *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium spp.* e *Aeromonas hydrophila* podem resultar em doenças transmitidas por alimentos quando estes não são tratados e conservados adequadamente. As células vegetativas dos microrganismos são destruídas com o tratamento térmico, mas seus esporos permanecem, tais como *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.* Eles podem sobreviver e precisam de condições muito mais severas para ser destruídos. Com a ausência de microbiota competitiva, estes esporos podem germinar e crescer em

condições favoráveis causados pela utilização indevida dos produtos (JAYASENA e JO, 2013).

As carnes e seus derivados são altamente propensos a contaminação microbiana, uma vez que eles são ricos em nutrientes essenciais e perecíveis na natureza, sendo que esta contaminação pode ser mais acelerada em função de alguns fatores intrínsecos incluindo pH e atividade de água da carne fresca. Normalmente, a carne fresca tem um valor de atividade de água maior do que 0,85 e seu pH está na faixa do pH favorável para as bactérias deteriorantes da carne (DAVE e GHALY, 2011).

Em função do dinamismo diário das pessoas, estas estão direcionando e realizando mudanças nos padrões nutricionais. Procurando benefícios creditados a uma alimentação saudável em todos os setores da alimentação, com isso, levando à busca por alternativas de transformação, conservação e alteração química destes produtos. Os objetivos da indústria alimentícia consistem basicamente em prolongar o período durante o qual o alimento permanece adequado para o consumo, aumentar a variedade da dieta, fornecer os nutrientes necessários para a manutenção da saúde e gerar lucros para os fabricantes.

Alguns microrganismos, quando encontrados em alimentos são chamados de indicadores, pois estes apontam a falta de cuidados no processamento dos alimentos, um deles é a *Escherichia coli* que é um microrganismo que coloniza o intestino de humanos e animais de sangue quente. Essa bactéria quando encontrada em alimentos ou águas, indica uma má qualidade sanitária, essa contaminação pode vir da falta de higiene do manipulador ou até mesmo durante a evisceração no abate (SKOČKOVÁ et al., 2015), e outro pode ser o *Staphylococcus aureus*, é um contaminante de produtos lácteos, carnes (principalmente de aves), ovos,atum, macarrão e outros, muitas vezes, são produtos que necessitam muita manipulação no preparo, em função disso deve-se ter cuidado ao manipular os alimentos isso pelo fato de que o *S. aureus* é um microrganismo que está presente na pele (CARMO et al., 2002).

O uso de aditivos alimentares no Brasil é norteado pelo Ministério da Saúde e regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

considerando aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, porém, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento, de acordo com as diretrizes preconizadas pela Portaria nº 540/97. Segundo esta mesma Portaria os aditivos químicos são classificados quanto à função: os agentes conservantes são substâncias que têm a finalidade de impossibilitar ou atrasar a deterioração microbiana ou enzimática dos alimentos (BRASIL, 1997).

Uma opção para o controle da contaminação microbiana são os antimicrobianos de origem vegetal, sendo que estes podem ser obtidos através de vários métodos como extração aquosa, infusões e decocções por solventes orgânicos entre outras, sendo que estas extrações são geralmente realizadas utilizando qualquer parte das plantas, sendo que muito possuem efeito antimicrobiano, como por exemplo componentes do orégano, cravo, canela, alho, coentro, alecrim, salsa, erva-cidreira, sálvia e vanilina (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Diante disso, estuda-se novos compostos que possam auxiliar na correta substituição dos conservantes, frequentemente utilizados no controle do crescimento de microrganismos, e que sejam confiáveis o suficiente para a inclusão em um sistema de conservação de alimentos. Levando em consideração este contexto, óleos essenciais de plantas condimentares já utilizados como flavorizantes e com alto potencial antimicrobiano ganham uma nova perspectiva de utilização (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

O aumento da demanda por alimentos seguros e naturais, sem conservantes químicos, incentiva os pesquisadores a estudar a atividade antimicrobiana de compostos naturais. Investigações confirmaram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais (RASOOLI et al., 2008).

A busca de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais, tem se mostrado bastante promissora nos últimos tempos, visando sanar os problemas da resistência microbiana a antibióticos atualmente utilizados (HAIDA et al., 2007).

A segurança alimentar e o atendimento às demandas para conservação e qualidade vem alavancando a pesquisa para o desenvolvimento de métodos alternativos na conservação de alimentos. Essas crescentes demandas abrem novas perspectivas para o uso de conservantes naturais, dentre eles, os derivados de plantas, bem como os condimentos (TIWARI et al., 2009).

Os condimentos originalmente utilizados para alterar ou melhorar o sabor dos alimentos, as ervas e especiarias possuem metabólitos secundários, como os óleos essenciais, que desempenham papel protetor de plantas contra agentes infecciosos como bactérias (BAKKALIL et al., 2008), sendo consideradas importantes substâncias bioativas, podendo serem utilizadas para a conservação de alimentos (SHAO; ZHOU; TSAO, 2011).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), pertencente à família Lamiaceae, originária de países do mediterrâneo, sendo que no Brasil também é cultivada. Além das suas propriedades medicinais conhecidas a atividade antimicrobiana é muito relatada. Estudos já realizados identificaram 33 compostos químicos no óleo essencial de alecrim. Os principais foram  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, cânfora, verbenona e borneol, constituindo cerca de 80% do total do óleo (SANTOYO, 2005).

Segundo Singh (2008), o gengibre é uma das ervas mais antigas conhecidas pelo povo, utilizado na culinária e na medicina e também conhecido pelas suas características como antioxidante e antibacteriana.

Considerando que muitos condimentos possuem características antibacterianas descritas na literatura, escolheu-se Gengibre (*Z. officinale*) e Alecrim (*R. officinalis*) para testar estas características em carne mecanicamente separada (CMS) contaminada. Diante disso esta pesquisa tem por objetivo realizar um estudo em relação à ação antimicrobiana e sua aplicação em um produto cárneo (CMS) analisando seus efeitos como conservante natural.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antimicrobiana de alecrim e gengibre, óleos essenciais e extratos aquosos, frente à *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P).

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Determinar a composição química dos óleos essenciais de alecrim e gengibre.
- Avaliar o extrato e óleo essencial dos diferentes condimentos quanto à atividade antimicrobiana em (CIM) Concentração Mínima Inibitória e (CBM) Concentração Bactericida Mínima;
- Avaliar a capacidade antimicrobiana do extrato e óleo essencial quando adicionados em carne mecanicamente separada de frango contaminada.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Extratos vegetais e óleo essencial**

Extratos brutos são aqueles onde todas as moléculas são extraídas na sua totalidade, sem que alguma seja isolada especificamente. As plantas produzem diferentes metabólitos secundários com funções variadas entre eles, defesa contra pragas e doenças, faz com que estas plantas possuam vários princípios ativos nos extratos vegetais (NELSON e COX, 2011). Segundo PERES (2007), a presença de vários compostos em um só produto pode ter efeito sinérgico benéfico, o que confere aos extratos vegetais certa vantagem sobre os antimicrobianos tradicionais que possuem apenas um princípio ativo.

Os óleos essenciais, possuem várias características sendo uma delas a ação na atividade antimicrobiana, esta ação ocorre devido a sua elevada hidrofobicidade, que permite atravessar as membranas bacterianas, provocando a perda de íons, reduzindo assim o potencial de proteção da membrana, ocorre também a perda da função das bombas de prótons e depleção de ATP (Adenosina trifosfato), ou até mesmo danos a proteínas, lipídios e organelas presentes dentro da célula bacteriana acarretando assim morte celular (PESAVENTO et al., 2015; BAKKALI et al., 2008).

Óleos essenciais, são obtidos de diversas partes de plantas, como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias, ervas medicinais e outras, sendo que estes podem ser designados como óleos etéreos, voláteis ou até mesmo como essências, chamados assim em função das suas características físico-químicas, como ser normalmente líquidos de aparência oleosa a temperatura



ambiente. A volatilidade é uma das mais importantes características, pois esta o diferencia dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas (SIMÕES, et al., 2004).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 2, de 15 de janeiro de 2007, óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtido por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Retificados são os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; concentrados são os que tenham sido parcialmente desterpenados; e desterpenados, aqueles dos quais tenha sido tirada quase totalmente os terpenos (BRASIL, 2007).

Os óleos essenciais no meio ambiente, possuem um papel importante na proteção das plantas como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, reduzindo seu interesse por essas plantas. Outra característica interessante é a capacidade de atrair alguns insetos para favorecer a dispersão de pólen e sementes, ou de repelir outros indesejáveis (CALO et.al., 2015).

### **2.1.1 Plantas condimentares**

Plantas condimentares são plantas que possuem características organolépticas que conferem um diferencial principalmente aos alimentos, como gosto requintado e aroma diferenciado, embelezando os pratos e tornando-os apetitosos e nutritivos, além dessas propriedades atuam como antissépticos, antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatórios entre outros (MATOS, 2007).

### **2.1.2 Alecrim**

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), pertence a família *Lamiaceae-Labiatae*, originária do Sul da Europa e do Norte da África, tem como características ser um subarbusto com ramificações de cor verde, possui hastes lenhosas e folhas pequenas (Figura 1), sendo que a composição química do seu óleo é constituído

principalmente por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila. Os terpenóides são representados pelo carnosol, ácidos carnosílico, oleânico, ursólico, diterpenos tricíclicos (SILVA et al., 2008).

As pesquisas em relação ao óleo do alecrim estão focadas principalmente em relação a sua capacidade antibacteriana, antifúngica, inseticida, anticarcinogênica e antioxidante (JÓRDAN et al., 2013). Este óleo essencial pode ser classificado de três formas em relação a sua composição química, *cineoliferum* (alto teor de 1,8-cineol, 53-67%); *camphoriferum* (cânfora >20%); e *verbenoniferum* (verbenona >15%) (NAPOLI et al., 2010). Segundo Rozman e Jersèk (2009), *R. officinalis* L., que é uma planta aromática e medicinal, possui o óleo mais utilizado em todo o mundo em função de suas propriedades biológicas.

Figura 1 – Estrutura foliar da planta do alecrim



Fonte: Google imagens

Várias pesquisas vem demonstrando a atividade do óleo do alecrim contra vários microrganismos patogênicos tanto para bactérias Gram-positivas quanto para as Gram-negativas (BARRETO, 2014). Diante dos resultados obtidos nas pesquisas tem sido sugerido que em função dos óleos essenciais possuírem compostos hidrofóbicos, estes são capazes de romper a membrana plasmática das células de

bactérias Gram-negativas, assim ocorrendo uma alteração na permeabilidade da membrana e consequentemente morte celular (HYLDGAARD et al., 2012; WANG et al., 2012).

### 2.1.3 Gengibre

*Zingiber officinale* foi inicialmente descrito, em 1807, pelo botânico William Roscoe. Pertence à família *Zingiberaceae*, proveniente da região sudoeste da Ásia e do Arquipélago Malaio, sendo que este inclui mais de 1200 espécies e 53 gêneros. O rizoma possui corpo alongado, um pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura (Figura 2). Sua coloração varia do amarelo ouro a marrom brilhante isso externamente, com estrias longitudinais (ELPO, 2004), algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos”, as quais surgem obliquamente. Na parte interna, de cor marrom-amarelada, apresentando uma endoderme amarela, com numerosos feixes fibrovasculares e abundantes células oleaginosas contendo oleoresina e 1% a 4% de óleo essencial (ZANCAN et al., 2002).

Figura 2 - Planta e rizoma do gengibre (*Zingiber officinale*)



Fonte: Google imagens

Popularmente conhecido como gengibre, é utilizado como condimento na culinária, pois este confere características picantes e refrescantes às receitas. Também é usado como planta medicinal, sendo que este apresenta várias características, tais como: antifúngica, antiviral, antibacteriana, antiulcerativa, antioxidante, antitumoral e outras. A parte da planta mais conhecida é o rizoma, o qual é rico em carboidratos, lipídeos, incluindo ácidos graxos livres, (ácido oléico, ácido palmítico, ácido linoleico), óleos (gingerol e gingerona) e óleos voláteis, (gingibereno, felandreno e canfeno) (LÓPEZ, 2007).

#### **2.1.4 *Metabolismo vegetal***

O metabolismo vegetal se divide em 2 partes em relação a produção de metabólitos, um é o primário (macromoléculas) e o outro secundário (micromoléculas). O metabolismo primário é o que produz as substâncias essenciais para a manutenção da vida da célula, sendo que este compreende a síntese de aminoácidos, proteínas, lipídios e outras moléculas responsáveis pela manutenção das reações vitais da célula. Os metabólitos primários são substâncias químicas que através de rotas biossintéticas complexas, e muitas vezes desconhecidas, dão origem aos metabólitos secundários (FILHO e PICCOLI, 2010; SIMÕES et al., 2004).

Os metabólitos secundários resultam da exposição e interação das plantas com o meio ambiente, produzindo assim substâncias que servem para sua proteção. Estes são normalmente uma estrutura complexa, demonstram alta atividade biológica, baixo peso molecular, normalmente encontrados em pequenas concentrações e são advindos de determinadas espécies de plantas (NELSON e COX, 2011).

Os produtos formados no metabolismo secundário podem ser subdivididos em três grandes partes: compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides. Os compostos fenólicos são encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Este grupo pode-se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas. Os compostos fenólicos são substâncias que possuem em sua estrutura química pelo menos um anel aromático, onde pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila,

derivados dos fenilpropanóides da via do ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2004; ROCHA, 2013).

Os alcalóides são substâncias naturais de baixo peso molecular, tem como característica a presença de um átomo de nitrogênio em sua estrutura básica. Constituem uma classe numerosa que é dividida em subclasses por apresentar vias de síntese não relacionadas evolutivamente. Um exemplo é a morfina isolada de *Papaver somniferum* (papoula) (WINK, 2003).

Os terpenos são metabólitos secundários de plantas. Estes podem formar classes com estruturas e funcionalidades diferentes, formadas a partir de cinco unidades carbono (C5), chamado de isopreno. Eles possuem muitos efeitos benéficos à saúde, como ação antiparasitária, antiinflamatória, antialérgica e incluindo a ação antimicrobiana e outras. Os principais terpenos são: monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), porém também existe os hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Os monoterpenos são formados a partir da união de duas unidades de isopreno (C10). Estas são as moléculas mais representativas que constitui 90% de óleos essenciais e permite uma grande variedade de estruturas (BAKKALI et al., 2008).

Os sesquiterpenos são formados a partir da montagem de três unidades de isopreno (C15). A extensão da cadeia aumenta o número de cyclisations que permite que uma grande variedade de estruturas. A estrutura e função dos sesquiterpenes são semelhantes às dos monoterpenos:  $\beta$ -bisabolene, cadinenes,  $\beta$ -cariofileno, logifolene, curcumenes, elemenes, farnesenes, zingibereno, bisabol, cedrol,  $\beta$ -nerolidol, farnesol, carotol,  $\beta$ -santalol, patchoulol, viridiflorol, germacrone,  $\beta$ -vetinone, turmerones, óxido de cariofileno, humuleno epóxidos e outros. Exemplos de plantas contendo estes compostos são: bergamota, cominho, aipo, citronela, coentro, eucalipto, gerânio, zimbro, lavanda, limão, menta, laranja, hortelã-pimenta, alecrim, sálvia, tomilho e outros (BAKKALI et al., 2008).

Alguns componentes dos óleos essenciais são capazes de sensibilizar a membrana celular, com isso aumentando a permeabilidade da mesma, assim causando um vazamento dos componentes intracelulares vitais, baixa no sistema

enzimático e respiração celular, por fim debilitando ou até causando a morte do microrganismo (CELIKEL; KAVAS, 2008).

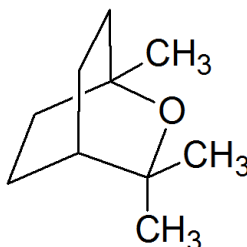
## 2.2 Principais componentes dos óleos de alecrim e gengibre

### 2.2.1 1,8 Cineol

É um monoterpeno, também conhecido como cajeputol, *1,8-epoxi-p-mentano*, *1,8-óxido-p-mentano*, eucaliptol entre outros (Figura 3). Líquido translúcido podendo ser amarelado. Pode ser encontrado em folhas de louro, artemísia, manjerição doce, absinto, alecrim, sálvia comum e outras folhagens planta aromática. Este composto é utilizado como aromatizante em vários produtos, incluindo produtos de panificação, confeitaria, produtos de carne e bebidas (SANTOS e RAO, 2000).

Segundo Auricchio e Bacchi (2003) óleos essenciais contendo citronelol, geraniol, cineol, linalol e sesquiterpenos são os compostos que demonstram possuir atividade antimicrobiana.

Figura 3 - Estrutura química do 1,8 Cineol



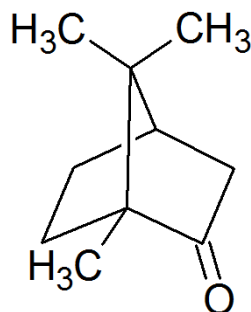
Fonte: Da autora

### 2.2.2 Cânfora

A cânfora é um monoterpeno bicíclico cetônico, com fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  (Figura 4), pode ser obtida do canforeiro (*Cinnamomum camphora*) e de outras plantas aromáticas como em algumas árvores da família do louro, nomeadamente *Ocotea usambarensis*. Folhas de alecrim secas da família das mentas, podem conter até 20% de cânfora. Industrialmente pode ser obtida a partir do  $\alpha$ -pineno. A cânfora tem como característica sabor amargo, forte odor e em contato com a pele causa uma sensação de frio. Seu uso vai desde o uso contra

gripes, contra histeria, nervosismo, neuralgia e diarreia por uso interno, e externamente empregada contra reumatismos, bronquites e inflamações até ação antibacteriana, pois esta era utilizada antigamente pelos egípcios para mumificação, com finalidade de conservação (ALSALME et al. 2010; KUMAR e ANDO, 2007; MOGRICH et al., 2005; MARTIN et al. 2004).

Figura 4 - Estrutura química da cânfora

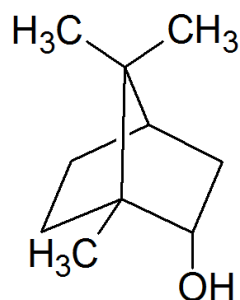


Fonte: Da autora

### 2.2.3 Borneol

É um composto orgânico classificado como um terpeno, bicíclico, pode ser encontrado em várias plantas aromáticas, e pode ser sintetizado a partir da redução da cânfora, a ação do borneol (Figura 5) pode ir desde aplicações medicinais (TANG et al., 2015), em cosméticos como sabonetes perfumes ou até mesmo produtos de limpeza (BHATIA; LETIZIA.; API, 2008), até ação antibacteriana, onde Mourey e Canillac (2002) relatam que quando utilizados óleos ricos em borneol estes exibiram ótimo desempenho em relação a capacidade bactericida o que comprova o já conhecido potencial desta substância.

Figura 5 - Estrutura química do borneol

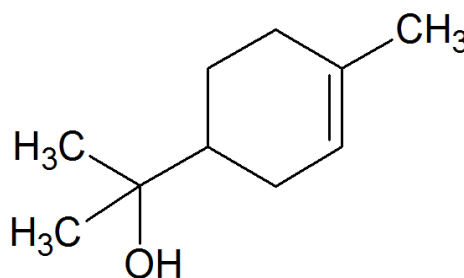


Fonte: Da autora

#### 2.2.4 $\alpha$ -terpineol

É um álcool monoterpreno (Figura 6), de odor agradável, volátil, encontrado naturalmente no óleo de cajepute, óleo de pinheiro e óleo de petitgrain, possui grandes propriedades antifúngicas e antissépticas, utilizado como aromatizante, cosméticos entre outras. Produzido sinteticamente através dos pinenos ou até mesmo da terebintina (CEBORSKA et al., 2015).

Figura 6 - Estrutura química do Alfa-terpineol

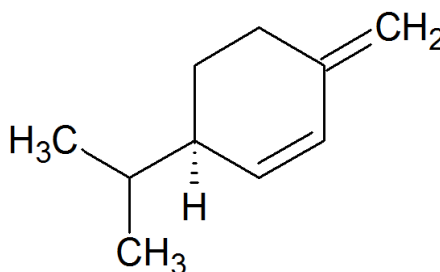


Fonte: Da autora

#### 2.2.5 $\beta$ -felandreno

$\beta$ -felandreno ( $C_{10}H_{16}$ ) é um monoterpreno (Figura 7) que possui um valor comercial como ingrediente essencial na formulação de remédios, produtos de limpeza, cosméticos, inseticida e também utilizado como combustível, o odor de  $\beta$ -felandreno tem sido descrito como picante e ligeiramente mentolado e cítrico (BENTLEY et al., 2013).

Figura 7 - Estrutura química do  $\beta$ -felandreno



Fonte: Da autora

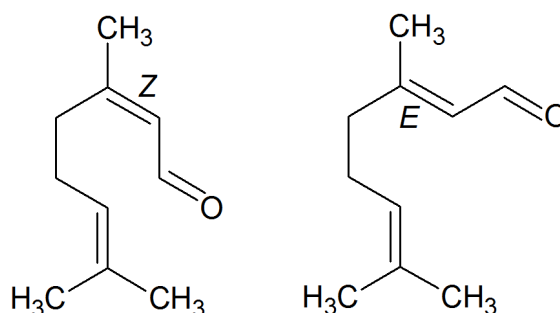


### 2.2.6 Neral e Geranial

O neral é um isômero do citral, onde o  $\alpha$ -citral é o geranial e o  $\beta$ -citral é o neral, que são aldeídos monoterpênicos acíclicos (Figura 8). O geranial tem um odor forte de limão. O neral tem um odor de limão menos intenso, porém mais doce. O citral é, portanto, é um composto aromático usado na perfumaria pelo seu efeito cítrico, cosméticos, conservante e também utilizado na síntese de vitamina A.

O citral também é usado na indústria alimentícia e para fortalecer o óleo de limão. Também possui forte ação anti-microbiana, e efeitos feromônicos em insetos (XIANG, 2015). O citral pode ser extraído da litsea cubeba, capim-limão, gengibre, e muitas outras plantas por possuírem uma quantidade abundante deste composto (HO et al., 2010, KIRAN et al., 2013, WILSON et al., 2002 e YANG et al., 2013). Segundo Abe et al. (2003) o geranial mostrou-se eficaz na ação antifúngica.

Figura 8 - Estrutura química do geranial e do neral



Fonte: Da autora

### 2.2.7 $\gamma$ -curcumeno e $\alpha$ -zingibereno

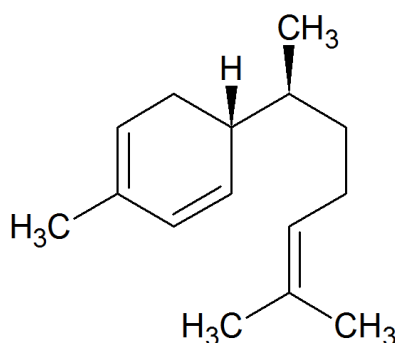
São hidrocarbonetos sesquiterpenos monocíclicos (Figura 9 e 10), possuem ação inseticida, repelente, sendo que estes podem ser extraídos a partir do rizoma de gengibre. Os principais constituintes do óleo de gengibre segundo Antonious (2003), foram  $\alpha$ -zingibereno (27-30%),  $\alpha$ -curcumeno (8-9%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (4,8%). e bisaboleno (3,2%). Sacchetti (2004), demonstrou em seus experimentos que o  $\alpha$ -zingibereno possui ação bactericida.

O gengibre possui sabor pungente do gingerol e shagaol, tendo zingibereno como componente predominante de óleos (ANTONIOUS, 2003). Nychas e

Skandamis (2003) relatam que  $\alpha$ -pineno, borneol, canfeno e linalol possuem propriedades antibacterianas. Segundo relatos o extrato de gengibre possui ação para inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *F. moniliforme* e *Mycobacterium sp.*. Óleos de gengibre mostraram-se muito bons em relação a inibição da *Salinococcus roceus*, *Holopogon turkmenicus* e *Halococcus morrhuae*.

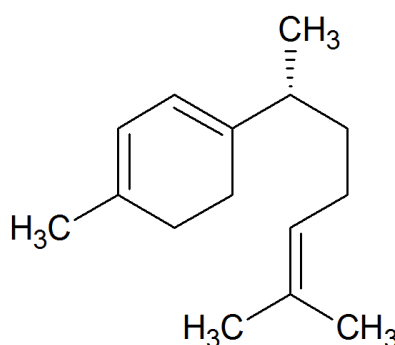
De acordo com alguns estudos realizados com óleo essencial e extrato alcoólico de gengibre frente a diversos patógenos alimentares verificaram ótima atividade antimicrobiana (SA-NGUANPUAG, 2011; YOUSUFIL, 2012; AHMED, 2012). Provavelmente estes relatos de ação bactericida se dá em função do  $\alpha$ -zingibereno e do curcumeno.

Figura 9 - Estrutura química do  $\alpha$ -zingibereno



Fonte: Da autora

Figura 10 - Estrutura química do  $\gamma$ -curcumeno

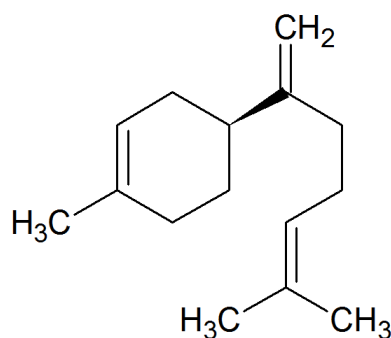


Fonte: Da autora

### 2.2.8 $\beta$ -bisaboleno

O  $\beta$ -bisaboleno é um sesquiterpeno (Figura 11), encontrado em várias plantas como orégano e gengibre, tem odor balsâmico, possui ação analgésica e anti-inflamatória e também é utilizado como aditivo alimentar (GARCIA E YAMAGUCHI, 2012). Segundo o relato de Andrade (2012) a composição do óleo essencial de *Zingiber officinale*, como sendo os compostos majoritários os monoterpenos oxigenados, geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%) e acetato de geranila (4,19%) e o monoterpeno bicíclico, canfeno (4,30%).

Figura 11 - Estrutura química do  $\beta$ -bisaboleno



Fonte: Da autora

## 2.3 Utilização do óleo essencial pela indústria

No processo de fabricação de derivados cárneos, como salsicha, mortadelas, presuntos e bacon, utiliza-se nitratos e nitritos como conservantes, sendo que estes são adicionados juntamente com os sais de cura, promovendo a formação e estabilidade da cor dos produtos cárneos e atividade antimicrobiana. Os nitratos são pouco tóxicos a níveis baixos, porém, os nitritos possuem uma toxicidade maior, pois são capazes de se combinar com compostos presentes nos alimentos, formando compostos nitrosos denominados nitrosaminas. Esses compostos tem-se mostrado cada vez mais com ação cancerígena e mutagênica. A sua formação e ocorrência estão sendo muito estudadas e relatadas com o intuito de se conhecer melhor esse tipo de contaminante e os riscos envolvidos com a ingestão destes (ARAUJO et al., 2008). Levando em consideração o descrito, uma opção de remediação ou

minimização dos efeitos colaterais do nitrito e do nitrato pode ser o emprego de princípios ativos de condimentos que possuem características antimicrobianas.

Condimentos e óleos essenciais são utilizados pela indústria de alimentos como agentes naturais para estender a vida útil dos alimentos. Os antimicrobianos de origem vegetal são obtidos através de vários métodos como extração aquosa, infusões, por solventes, entre outras, sendo que estas extrações são geralmente realizadas utilizando flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, madeira, frutos e raízes de plantas. Muitos possuem efeito antimicrobiano, como por exemplo componentes do orégano, cravo, canela, alho, coentro, alecrim, salsa, erva-cidreira, sálvia e vanilina (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Existem mais de 1340 plantas com compostos antimicrobianos definidos, e mais de 30.000 componentes foram isolados a partir de compostos de óleo vegetal que contêm grupos fenólicos, que é utilizado na indústria alimentícia. No entanto, somente alguns óleos essenciais possuem propriedades como conservantes sendo utilizadas, portanto segundo (BURT, 2004) há uma necessidade de mais avaliações e estudos do óleo essencial na área dos alimentos.

Segundo Tajkarimi; Ibrahim; Cliver, (2010), antimicrobianos de origem vegetal são mais comumente produzidos pela destilação a vapor (DV) e hidrodestilação (HD) e métodos alternativos, como extração com fluído supercrítico (SFE) proporcionam maior solubilidade assim melhorando as taxas de transferência de massa. Além disso, a manipulação de alguns parâmetros tais como a temperatura e a pressão podem acarretar a extração de componentes diferentes, isso quando um componente específico é necessário.

## **2.4 Carne Mecanicamente Separada (CMS)**

Segundo a Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000, entende-se por Carne Mecanicamente Separada (CMS) a carne obtida por processo mecânico de moagem e separação de ossos de animais de açougue, destinada a elaboração de produtos cárneos específicos (BRASIL, 2000).

Para a produção de CMS (Figura 12) somente é permitido utilizar ossos, carcaças ou partes de carcaças de animais de açougue (Aves, Bovinos e Suínos),

que tenham sido aprovados para consumo humano pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Não pode utilizar outras partes como cabeças, pés e patas (BRASIL, 2000).

Figura 12 - Carne mecanicamente separada (CMS) de frango



Fonte: Google imagens

As características físico-químicas básicas da CMS consistem em: Proteína (Mínimo): 12%; Gordura (Máximo): 30%; Teor de Cálcio (Máximo): 1,5% (Base Seca); Diâmetro dos Ossos: 98% deverão ter tamanho (Máximo) de 0,5 mm; Largura (Máximo) de 0,85 mm; Índice de peróxido (Máximo): 1 mEq KOH por kg de gordura (BRASIL, 2000).

Essa problemática em relação a textura pode estar relacionada em função do processo de separação mecânica, onde a carne é retirada do osso, pois esta sofre ruptura celular, alguma desnaturação proteica e um aumento de grupamentos heme livres. Com isso, além da textura ser afetada, esse processo também pode afetar na coloração da carne, palatabilidade, sabor e carga microbiana, tornando-se assim uma matéria-prima altamente perecível (BODNER e SIEG, 2009), sendo assim, se esta não for manipulada adequadamente pode acarretar em produtos de baixa qualidade.

As características físico-químicas e microbiológicas da CMS são de grande importância, pois através delas pode-se determinar a sua qualidade e aplicação.

A carne mecanicamente separada deve atender aos requisitos de temperatura, para garantir a sua qualidade, isso pelo fato de ser uma carne bastante suscetível a contaminação. Então, segundo Brasil (2000), a carne que não for utilizada diretamente como ingrediente de um produto cárneo, logo após o processo de separação mecânica, a mesma deverá ser refrigerada a uma temperatura não superior a + 4 °C, por no máximo 24 horas ou, se armazenada no máximo até 0 °C, poderá ser utilizada em até 72 horas após sua obtenção e, também, se a carne mecanicamente separada for congelada deverá ser em blocos com espessura máxima de 15 cm e conservada em temperatura não superior a -18 °C pelo prazo máximo de 90 dias.

Nos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação da carne mecanicamente está previsto  $5 \times 10^3$  UFC/g de *S. aureus*. Para *E. coli* não há padrões estabelecidos (BRASIL,2000).

A CMS provem a partir de peças que sobram depois da desossa realizada para cortes especiais de carne, pois estas peças possuem uma grande quantidade de carne que não foi totalmente retirada dos ossos, durante este procedimento. Esta carne normalmente é utilizada em produtos onde se utiliza carne triturada para sua elaboração devido a sua consistência e custo relativamente baixo em relação a outros cortes de carne (PEREIRA et al., 2011).

As maiores utilizações da CMS são em salsichas, mortadelas, patês, empanados entre outros, pois esta carne possui características funcionais como textura gelatinosa, retenção de água e também uma grande capacidade de emulsionar a gordura, isso em função da proteína presente, estas propriedades são de grande valia na hora de escolher as matérias primas do produto a ser elaborado, porém algumas constatações em relação a textura da CMS em produtos acabados vem sendo discutidos, pois a relatos que esta deixa o produto com uma textura muito mole (DAROS; MASSON; AMICO, 2005), sendo assim muitas vezes necessário a adição de coadjuvantes que melhoram a estabilidade estrutural do produto.

## 2.5 Segurança alimentar e Contaminação

A definição de um alimento seguro pode ser dada em função de seus constituintes ou contaminantes, que podem causar danos à saúde, estarem ausentes ou em concentrações abaixo do limite de risco (SOUZA; SILVA; SOUSA, 2005). A segurança alimentar pode ser afetada em função de vários fatores como matérias primas de baixa qualidade e contaminadas, manipulação inadequada, uso inadequado e indiscriminado de aditivos químicos, contaminação cruzada, degradação de nutrientes entre outros.

O constante treinamento para educação de uma manipulação adequada de alimentos pode contribuir para aumentar a segurança do manipulador no manuseio de alimentos, com isso ampliar as perspectivas educacionais deste e assim fornecer à população um alimento seguro, do ponto de vista microbiológico (LEVINGER, 2005).

Levando em consideração que as técnicas do controle da qualidade das indústrias de alimentos estão cada vez mais avançadas ainda a segurança alimentar é um item bastante problemático em relação a saúde pública (WHO, 2002a). Segundo OMS, (2002), 30% das pessoas de países industrializados sofrem com doença de origem alimentar por ano. Outro dado alarmante é que no ano de 2000 aproximadamente dois milhões de pessoas no mundo vieram a óbito em função de doenças diarreicas.

Diante do relato nota-se a necessidade de novos métodos de redução ou eliminação de patógenos dos alimentos, sem aumentar a carga de aditivos/conservantes químicos artificiais nos produtos, mas sim uma sinergia com aditivos naturais (BURT, 2004).

A Organização Mundial da Saúde está fazendo uma campanha mundial para a redução do consumo de sal, em função das doenças cardiovasculares envolvidas no consumo excessivo de sal (WHO, 2002b), no entanto, se esta proposta for aceita pelas indústrias alimentícias, alguns critérios de formulação dos produtos deverão ser revistos, pois sabe-se que o sal possui característica antimicrobiana, portanto, se reduzido o seu teor, o alimento estará mais propenso a contaminações, sendo

assim necessária a adição de outros aditivos para manter a segurança dos alimentos, levando tudo isso em consideração, uma ótima opção é o uso de óleos essenciais com características antimicrobianas (BURT, 2004), além de ter o papel de conservante os óleos essenciais possuem um apelo mercadológico muito grande por ser natural.

## 2.6 Microrganismos patogênicos

A contaminação por microrganismos patogênicos pode ocorrer em toda a cadeia produtiva, desde a produção primária (plantio, manuseio, transporte, cozimento, acondicionamento) até o consumo. Vários dados disponíveis de surtos de intoxicação/infecção alimentar apontam como agentes mais frequentes os de origem bacteriana, sendo eles *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2010).

*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. entérica* e *E. coli* são conhecidos como microrganismos patogênicos (transmissores de doenças) e são frequentemente isoladas de carnes ou seus derivados (BORCH e ARINDER, 2002).

A deterioração de um alimento normalmente é devido a presença de bactérias nos alimentos, com isso reduzindo sua vida de prateleira e possibilitando ainda a veiculação de patógenos, acarretando potenciais riscos à saúde pública. Sendo assim é necessário um controle efetivo para garantia da qualidade em todos os estágios de sua elaboração até o produto final (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

Os alimentos de origem animal ou vegetal apresentam em sua origem uma microbiota habitual. A grande dificuldade é impedir a colonização natural por esta microbiota, além da contaminação por outros microrganismos durante o processamento dos alimentos. Os principais agentes patogênicos têm como características em comum: curto período de incubação, quadro clínico gastrointestinal, acompanhado ou não de febre. As complicações decorrentes das doenças causadas por alimentos contaminados vêm aumentando gradativamente, sendo responsáveis por alto número de hospitalizações e, em alguns casos, com consequências irreversíveis ao paciente (GERMANO e GERMANO, 2003).



Normalmente os microrganismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos são as bactérias, pois estas sobrevivem em vários tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH, e condições do meio ambiente. Levando em consideração que muitos microrganismos estão se tornando resistentes a sanitizantes e antibióticos, e também tendo em vista a tendência do mercado de utilizar produtos ecologicamente seguros, a utilização de óleos essenciais como conservante natural vem sendo muito cogitado e estudado, com isso gerando o desenvolvimento de novas técnicas e produtos que potencializam a redução dos efeitos negativos de oxidantes e microrganismos causadores de grandes prejuízos às indústrias alimentícias (PEREIRA et al., 2008).

### **2.6.1 *Escherichia coli* e sua contaminação**

Coliformes totais é um grupo de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, não são formadores de esporos, são Gram-negativos em forma de bacilos, anaeróbio facultativo, e quando submetidos a uma incubação a 35 – 37 °C/48h estes são capazes de fermentar a lactose produzindo assim gás. Uma representante deste grupo é a *Escherichia coli*, sendo que esta tem seu hábitat inicial o trato intestinal dos animais e humanos, e sob incubação a 44-45,5 °C, possui a capacidade de continuar a formar gás a partir da fermentação da lactose (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

*E. coli* é encontrada nas fezes de animais de sangue quente, incluindo seres humanos, em concentrações relativamente altas, sendo que esta pode variar de  $10^6$  a  $10^7$  células/g nas fezes de humanos. Este microrganismo é há muito tempo reconhecido por sobreviver muito bem no meio ambiente, motivo pelo qual pode ser considerado um indicador de contaminação fecal em água e alimentos, mais antigo já relatado (LUNESTAD et al., 2016).

A *E. coli* possui diferentes linhagens já identificadas como patogênicas tanto para o homem quanto para animais, sendo que estas podem acarretar infecções graves, muitas vezes podendo levar o enfermo a óbito. Esse microrganismo muitas vezes pode estar em pequenas quantidades em um alimento recém processado ou manipulado, porém se este alimento for armazenado de forma inadequada pode

permitir a multiplicação deste causando uma infecção intestinal (LEITE e FRANCO, 2006).

Um dos principais atributos da qualidade microbiológica é indicar a integridade dos produtos alimentícios e da higiene com que estes foram processados. As análises de coliformes e da *E. coli* foram adotadas mundialmente pelas indústrias de alimentos pelo fato de que principalmente a *E. coli* sugere contaminações de origem fecal, diretas ou indiretas dos seres humanos e animais. Elevada contagem de *E. coli* e coliformes totais em amostras de alimentos demonstram ou indicam uma deficiência nas boas práticas de fabricação (SANGADKIT et al., 2012).

A *E. coli* coloniza o intestino humano algumas horas após o nascimento não causando enfermidades. Essa interação com as células epiteliais intestinais é benéfica e, nesse contexto, *E. coli* atua competindo, criando uma barreira para que os patógenos não colonizem o intestino. Porém, essa bactéria pode agir como um organismo que se aproveita de indivíduos que estão fragilizados, causando doenças, infecções em tecidos e órgãos saudáveis (SOUSA, 2006).

Ao se contaminar com esta bactéria o indivíduo pode sofrer de infecções que podem ocorrer somente em mucosas ou podem se alastrar pelo organismo causando infecções gastrointestinais. Os sintomas podem ser desde diarreias, vômitos, dores de cabeça, cólicas entre outras, não tendo um tratamento específico, porém o excesso de vômito e diarreia pode causar grave desidratação, então o que se recomenda é uma ingestão maior de líquidos para hidratar (SOUSA, 2006).

A contaminação com *E. coli* pode se dar em função do consumo de alimentos com deficiências no processo de fabricação, sendo esta muitas vezes uma contaminação cruzada advinda da falta de higiene pessoal, manipulação inadequada por parte do colaborador ou também matéria prima e processos em desacordo com os princípios higiênico sanitários.

### **2.6.2 *Staphylococcus aureus* e sua Contaminação**

O *Staphylococcus aureus*, é do gênero *Staphylococcus* e filo *Firmicutes*, é a espécie mais significativa pelo fato de ser patogênica, é um microrganismo Gram

positivo, anaeróbio facultativo e se apresenta em forma de cocos, sendo que a enterotoxina produzida pelo *Staphylococcus aureus* é uma das grandes causadoras de intoxicações alimentares (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Segundo Costa (2008), *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Vibrio* e os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* são os microrganismos mais encontrados em caso de intoxicação alimentar. Estes destroem a flora intestinal através da sua proliferação ou ação das suas enterotoxinas. Diarreia, vômito, dores abdominais, náuseas, sudorese e cefaleia são os principais sintomas de uma pessoa com intoxicação alimentar.

Tan; Lee; Mahyudin, (2014) relatam que uma das maiores fontes de contaminação é advinda dos manipuladores de alimentos em função da contaminação cruzada, sendo que este microrganismo em contato com o alimento encontra um ambiente propício para sua proliferação e com isso a produção de uma toxina termoestável, assim, causando uma intoxicação alimentar no consumidor.

### 3 METODOLOGIA

Para este trabalho utilizou-se dois condimentos, Gengibre (*Zingiber officinale*) *in natura* e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) seco, sendo que destes realizou-se a extração de óleo essencial utilizando o aparelho de Clevenger modificado e extração aquosa por infusão.

Depois de ter realizado as extrações dos óleos, analisou-se sua composição (cromatografia) e atividade antimicrobiana (Concentração inibitória mínima e Concentração bactericida mínima). Diante destes resultados, dosou-se o óleo essencial em CMS previamente esterilizada e posteriormente contaminada com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e, por fim, analisou-se a diminuição ou eliminação dos microrganismos. Realizou-se todos os procedimentos nos laboratórios da instituição sendo estes em triplicata. Decidiu-se não utilizar os extratos em função sua baixa performance em relação a ação antimicrobiana.

#### 3.1 Amostras

As amostras de folhas secas de alecrim foram adquiridas em uma loja de produtos naturais de Lajeado-RS. Adquiriu-se a raiz de gengibre de uma fruteira em Montenegro-RS e a CMS, de uma empresa do Vale do Taquari, RS.

## 3.2 Obtenção dos extratos

### 3.2.1 Óleo essencial

Levando em consideração a Farmacopeia Brasileira (1988-2005) realizou-se a extração através da destilação por arraste de vapor de água com auxílio do aparelho Clevenger modificado (Figura 13), onde, triturou-se os condimentos, após colocou-se em um balão de fundo redondo de 5 L, com aproximadamente de 3 L de água destilada. Aqueceu-se o sistema até a fervura, assim ocorrendo o arraste do óleo essencial pelo vapor-de-água. Após a condensação, os líquidos (óleo essencial e água) se separam no extrator. Após um período de três horas e meia, removeu-se o óleo por gravidade para um recipiente adequado. Então tratou-se o óleo com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para remoção da água residual, calculou-se o rendimento e armazenou-se sob refrigeração e ao abrigo da luz, até o momento da sua utilização.

Figura 13 - Aparelho de extração Clevenger modificado



Fonte: Da autora

### **3.2.2 Extrato aquoso**

Obteve-se o extrato aquoso pelo método de infusão, utilizando como solvente água destilada. Reduziu-se condimento a fragmentos de pequena dimensão, utilizando um liquidificador industrial. Em seguida, adicionou-se 100 g de condimento em 1000 mL de água destilada fervente (90 °C), repousando durante 30 minutos. Após, filtrou-se o material e utilizou-se o rota-evaporador BÜCHI R3 para a remoção da água sendo este em banho termostatizado Marconi MA-184, em temperatura de 40 °C. Ao final, calculou-se o rendimento e guardou-se os extratos totais sob refrigeração e ao abrigo da luz até sua utilização.

## **3.3 Processos de purificação e identificação**

### **3.3.1 Análise da composição química do óleo essencial**

Identificou-se os constituintes dos óleos essenciais através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) juntamente com a determinação do índice de retenção de Kovats (IK).

### **3.3.2 Cromatografia gasosa e o Índice de Kovats**

Realizou-se a análise do óleo essencial na Central Instrumental do Centro Tecnológico de Pesquisa e Produção de Alimentos – CTPPA – da UNIVATES.

Solubilizou-se alíquotas de 1,5 µL dos óleos essenciais em 1,5 mL de n-hexano bidestilado e em um cromatógrafo a gás Shimadzu (modelo GC2010 Plus) acoplado a um detector de massas do mesmo fabricante (modelo GCMSQP2110 Ultra), operado a 70 eV, em coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Como gás de arraste empregou-se o hélio. As injeções das amostras foram da ordem de 1 µL, utilizando autoinjeter AOC-5000 Plus (Shimadzu). Para a análise empregou-se as seguintes condições: temperatura do injetor: 240 °C; modo de injeção: razão de split 1:20 com purga de 3 mL/min; controle de fluxo de gás: velocidade linear; fluxo de gás de arraste: 1,00 mL/min; programa: 50 °C, 290 °C (4 °C/min); temperatura da interface do espectrômetro de massas: 280 °C, temperatura da fonte de íons: 260 °C. Identificou-se a maioria dos constituintes

utilizando o índice de Kovats em comparação com uma mistura de alcanos, espectros de massas de padrões puros (NIST111, 2011) e comparação com dados da literatura (ADAMS, 2009).

Para o cálculo do índice de retenção de Kovats (IK ou Ir), utilizou-se uma mistura de padrões de alcanos não ramificados (C7 a C30 – Sigma-Aldrich 49451-U). Diluiu-se esta amostra em n-hexano e analisou-se. Os índices de retenção dos compostos foram obtidos de acordo com a equação abaixo (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963):

$$Iri = 100 a + \Delta n \frac{tri - tra}{trb - tra}$$

onde:

- Iri = índice de retenção i
- i = constituinte do óleo essencial que está sendo analisado.
- a = número de carbonos do alcano que elui *antes* de i.
- b = número de carbonos do alcano que elui *depois* de i.
- $\Delta n$  = número de carbonos do alcano que elui *depois* de i menos número de carbonos do alcano que elui *antes* de i.
- tri = tempo de retenção de i.
- tra = tempo de retenção do alcano que elui *antes* de i.
- trb = tempo de retenção do alcano que elui *depois* de i.

### 3.4 Aspectos químicos e biológicos

#### 3.4.1 Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana e da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizou-se a linhagem padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P). Os microrganismos liofilizados foram cedidos pelo Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

#### **3.4.1.1 Diluição do extrato e do óleo essencial**

Para a obtenção da solução de trabalho pesou-se 0,2 g de cada extrato e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL. Adicionou-se 0,04 mL de DMSO e uma porção de água deionizada estéril. Após a solubilização do extrato, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, completou-se o volume com água deionizada estéril. Desta forma, obteve-se uma solução de 40 mg/mL.

Para obtenção da solução de óleo essencial pesou-se 0,2 g de óleo e adicionou-se 0,04 mL de Twem e adicionou-se água deionizada estéril até completar 5 mL. Após a solubilização do extrato, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, completou-se o volume com água deionizada estéril. Desta forma, obteve-se uma solução de 40 mg/mL

#### **3.4.1.2 Substância empregada como padrão antimicrobiano**

Utilizou-se a gentamicina 0,2 mg/mL, como padrão antibiótico para verificação da atividade antimicrobiana.

#### **3.4.1.3 Controle do diluente**

Preparou-se uma solução para o controle do diluente. Em um balão volumétrico de 5 mL, adicionou-se 0,04 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) para o extrato aquoso e Twem para o óleo essencial e completou-se o volume com água destilada estéril.

#### **3.4.1.4 Padronização do inóculo**

A partir das linhagens bacterianas liofilizadas, reidratou-se as culturas, ressuspensando o sedimento com 0,3 a 0,5 mL do meio líquido recomendado em Muller Hinton a 37 °C/24 horas. Após ocorrido o crescimento bacteriano, preparou-se as suspensões microbianas. Para isso adicionou-se uma alçada do microrganismo a 10 mL de solução salina 0,8 % estéril até a obtenção de uma turbidez equivalente à escala nefelométrica de McFarland em 0,5, que é indicativo da presença de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para garantir a quantidade de inóculo presente, realizou-se o indicado pelo NCCLS (2003), onde então realizou-se a leitura da turbidez em espectrofotômetro



UV-VIS Genesys 10S UV-VIS, no comprimento de onda 625 nm com o propósito de garantir que o padrão produzido estava de acordo com o descrito pela literatura (0,08 a 0,13 nm).

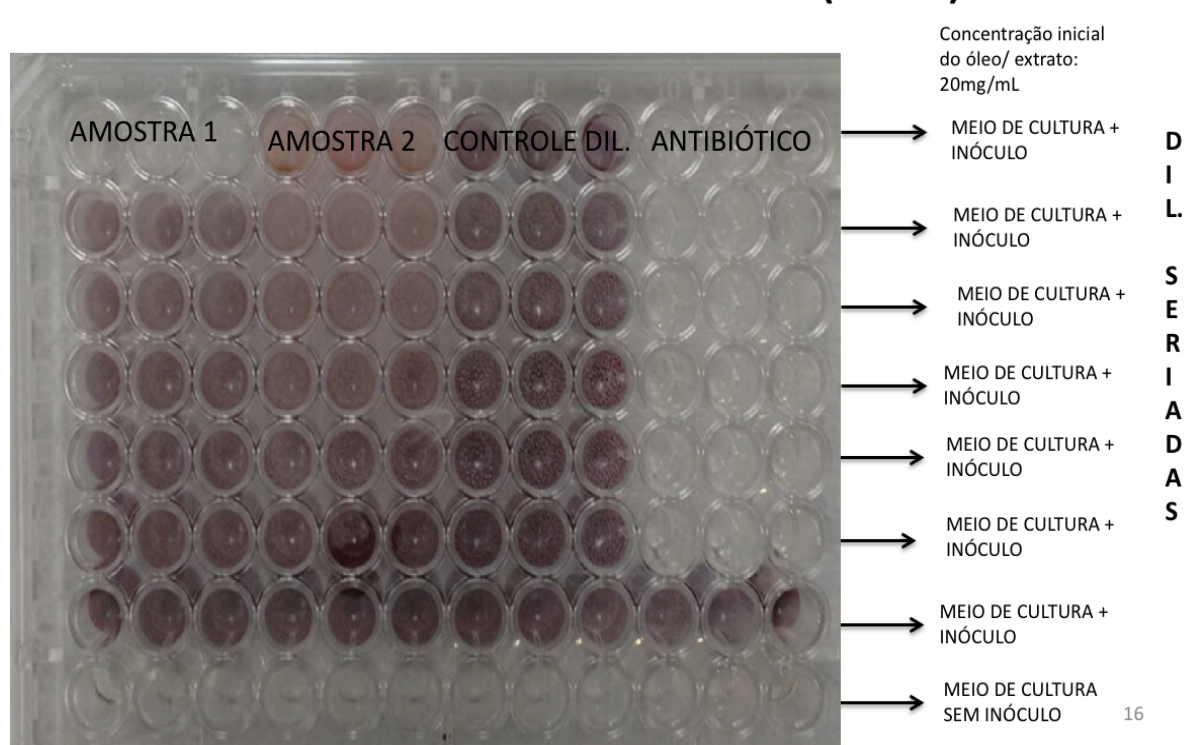
#### **3.4.1.5 Concentração Inibitória Mínima – CIM**

Realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima dos extratos, segundo a metodologia da diluição em caldo (microdiluição), conforme as normas descritas pelo "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) (NCCLS document M07-A9, 2012), onde utilizou-se placas de acrílico com 96 poços, de acordo com a (Figura 14). Em cada placa aplicou-se os extratos, o antimicrobiano (gentamicina) e o diluente (DMSO), todos em triplicata. Também colocou-se os controles negativos (meio sem adição de inóculo) e controles positivos (meio com adição de inóculo).

Realizou-se a microdiluição em capela de fluxo laminar. Inicialmente transferiu-se alíquotas de 200 µL do inóculo padronizado a tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Mueller Hinton (200 µL em cada) sendo que deixou-se alguns tubos sem inóculo (controle negativo).

Após a inoculação, incubou-se as placas. Transcorrido o tempo de incubação, realizou-se a leitura das mesmas. A confirmação de crescimento bacteriano é representada pela turvação do poço e a ausência de crescimento foi representada pelo poço límpido. O primeiro poço onde não se observa crescimento (de maior diluição) corresponde ao valor da concentração inibitória mínima.

Figura 14 - Placa de 96 poços para a confirmação da CIM



Fonte: Da autora

#### 3.4.1.6 Confirmação da Concentração Inibitória Mínima

Como os extratos possuem coloração, realizou-se a confirmação de crescimentos nos poços por meio da aplicação da solução aquosa estéril de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% (TTC). Essa solução revela o crescimento bacteriano por meio do desenvolvimento de uma coloração vermelha, pois forma um complexo vermelho com a enzima da respiração celular dos organismos vivos, assim nos poços onde há crescimento bacteriano haverá o desenvolvimento da coloração.

#### 3.4.1.7 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para determinação da concentração bactericida mínima do extrato aquoso e do óleo essencial realizou-se semeaduras em placas de ágar Muller Hinton (Figura 15) de todos os poços onde o extrato se apresentou límpido, para afirmar a ação do mesmo. Incubou-se estas placas a 36 °C +/- 1 °C por 24 horas.

Para interpretação dos resultados considerou-se os seguintes critérios: o crescimento do microrganismo no meio de cultura significa ação bacteriostática; e a ausência de crescimento do microrganismo no meio de cultura significa ação bactericida.

Figura 15 - Placa de Petri com Muller Hinton para confirmação da CBM



Fonte: Da autora

### **3.4.2 Análises de contagem bacteriana da carne mecanicamente separada (CMS) contaminada adicionada de óleo essencial**

Primeiramente buscou-se a CMS na empresa fornecedora, tomando todos os cuidados de transporte, após esterilizou-se, em autoclave a 121 °C por 15 min., uma porção suficiente para as amostragens. As amostras foram constituídas de 10 g de CMS esterilizada, pesadas em sacos de stomacher estéreis, onde adicionou-se primeiramente e 1 mL do inóculo, homogeneizou-se bem e, após, adicionou-se três concentrações do óleo, C1 (1 µL/g), C2 (5 µL/g) e C3 (10 µL/g), homogeneizou-se novamente. Por fim analisou-se o crescimento bacteriano das amostras em quatro tempos, T0 (0 horas), T1 (24 horas), T2 (48 horas) e T3 (72 horas), sendo que realizou-se quatro diluições seriadas para cada amostra, como descrito a seguir. Também realizou-se um controle negativo 1B (carne) e um positivo 2B (carne + microrganismo), sendo estes realizados para cada tempo e microrganismo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Preparação do inóculo:

Para os dois microrganismos realizou-se uma suspensão bacteriana ajustada a 0,5 da escala de McFarland, sendo que esta corresponde a  $10^8$  UFC/mL (Unidades formadoras de colônias). Desta suspensão retirou-se 1 mL e transferiu-se para um tubo contendo 9 mL de solução salina peptonada, gerando a diluição  $10^7$  UFC/mL, sendo que desta diluição transferiu-se 1 mL para a primeira amostra gerando  $10^6$  UFC, e assim sucessivamente até  $10^3$  UFC.

Para as análises de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus*, utilizou-se a metodologia adaptada de Brasil (2003), que serão detalhadas nas subseções seguintes.

#### **3.4.2.1 Análise de contagem de coliformes termotolerantes**

Pesou-se 10 g da amostra. Adicionou-se 90 mL de solução salina peptonada 0,1 %. Homogeneizou-se por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

Prova presuntiva

Inoculação:

A partir da diluição inicial, efetuou-se as demais diluições em solução salina peptonada 0,1%. Inoculou-se 1 mL de cada diluição em placas de Petri esterilizadas. Adicionou-se a cada placa cerca de 15 mL de (Ágar bile vermelho violeta) VRBA previamente fundido e mantido a 46 °C – 48 °C em banho-maria. Homogeneizou-se cuidadosamente e deixou-se em repouso até total solidificação do meio. Adicionou-se, sobre cada placa, cerca de 10 mL de VRBA previamente fundido e mantido a 46 °C – 48 °C em banho-maria, formando uma segunda camada de meio. Deixou-se solidificar.

Incubação:

Após completa solidificação do meio, incubou-se as placas em posição invertida em temperatura de  $36 \pm 1$  °C por 18 a 24 horas.

Leitura:

Selecionou-se placas que continham entre 15 e 150 colônias. Contou-se as colônias que apresentavam morfologia típica de coliformes, ou seja, colônias róseas

com 0,5 a 2 mm de diâmetro rodeadas ou não por uma zona de precipitação da bile presente no meio. Anotou-se os resultados de contagem.

#### **3.4.2.2 Contagem de *Staphylococcus aureus***

1) Pesagem e preparo da amostra: Pesou-se 10 g da amostra, adicionou-se 90 mL de solução salina peptonada 0,1%. Homogeneizou-se por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”.

2) Inoculação: A partir da diluição inicial, efetuou-se as diluições desejadas. Inoculou-se, sobre a superfície seca do ágar Baird-Parker, 0,1 mL de cada diluição selecionada. Com o auxílio de alça de Drigalski, espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção.

3) Incubação: Incubou-se as placas invertidas a  $36 \pm 1$  °C por 30 a 48 horas.

4) Leitura: Selecionou-se as placas que continham entre 20 e 200 colônias. Contou-se as colônias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Rendimento dos extratos

Primeiramente, determinou-se o rendimento do óleo essencial de gengibre e alecrim e posteriormente o rendimento do extrato aquoso dos mesmos, conforme resultados demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento do óleo essencial e do extrato aquoso de alecrim e gengibre

Planta	% Rendimento	
	Óleo essencial	Extrato aquoso
Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	1,97	14,98
Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	0,18	5,02

Na Tabela 1 verifica-se que o alecrim teve um rendimento maior tanto para o extrato aquoso quanto para o óleo essencial, em relação ao gengibre. Obteve-se um rendimento de 1,97% e 0,18% para o óleo, respectivamente, e para os extratos aquosos de alecrim e gengibre, tendo um rendimento de 14,98 e 5,02%, respectivamente.

Zaouali; Bouzaine; Boussaid (2010) analisaram seis amostras de alecrim, onde obteve rendimentos dos óleos essenciais que variaram entre 1,17% a 2,7%, corroborando assim com o encontrado Tabela 1.

Uçar et al. (2013), em seus experimentos, obtiveram 16% de extrato aquoso de alecrim, demonstrando assim uma proximidade ao encontrado, Tabela 1.

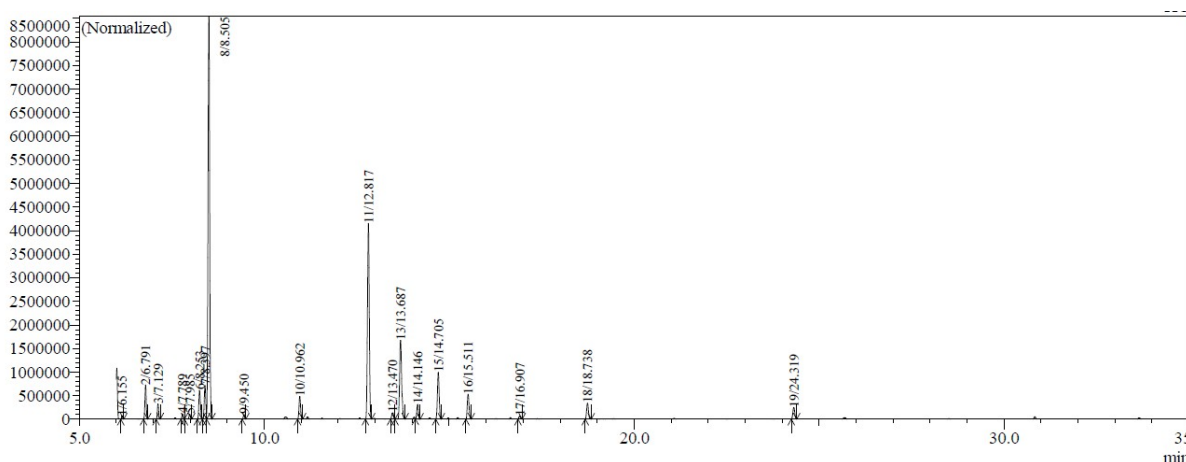
Pereira et al. (2007) encontraram em seus estudos com gengibre um rendimento de óleo essencial que variaram de  $0,3 \pm 0,02\%$  em base úmida, sendo que no experimento deste relatório encontrou-se 0,18%, estando próximo ao que este autor encontrou.

Yehb et al. (2014), pesquisaram duas espécies de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), onde encontrou 15,84% e 10,86% de extrato aquoso, não condizendo com o encontrado nesta pesquisa Tabela 1, esta diferença pode ter ocorrido em função das espécies serem diferentes ou até mesmo a região em que foi plantada.

#### 4.2 Análise cromatográfica dos óleos essenciais de alecrim e gengibre

Na Figura 16 pode-se observar o cromatograma do óleo de alecrim, onde pode-se verificar a presença de 18 sinais entre 5 e 25 minutos de corrida cromatográfica. Na Tabela 2 estão relacionados os componentes encontrados do óleo de alecrim, onde pode-se verificar que 18 componentes foram identificados, atingindo 99,67% de um total de 100%, sendo que desse identificados 98,28% são monoterpenos (11,4% monoterpenos hidrocarbonetos e 88,27% monoterpenos oxigenados) e por fim 1,39% são os sesquiterpenos oxigenados, neste total encontram-se os compostos majoritários como, 1,8-cineol (40,77%), cânfora (22,27%), borneol (9,73%) e  $\alpha$ -terpineol (5,14%).

Figura 16 - Cromatograma do óleo essencial de alecrim



Fonte: Da autora

Tabela 2 - Componentes do óleo essencial de alecrim

Pico	Nome	TR (min.)	IK exp.	ik lit.	Área %
1	2,4-tujadieno	6,155	962	960	0,25
2	$\beta$ -pineno	6,791	982	979	2,79
3	<u>mirceno</u>	7,129	993	990	1,22
4	<u>3-<math>\delta</math>-careno</u>	7,789	1012	1011	0,44
5	<u><math>\alpha</math>-terpineno</u>	7,985	1018	1017	0,4
6	<u>p-cimeno</u>	8,253	1026	1024	2,58
7	<u>limoneno</u>	8,397	1030	1029	3,32
8	1,8-cineol	8,505	1033	1031	40,77
9	<u><math>\gamma</math>-terpineno</u>	9,450	1059	1059	0,4
10	<u>linalol</u>	10,962	1102	1096	2,18
11	<u>cânfora</u>	12,817	1147	1146	22,27
12	<u>trans-pinocamfona</u>	13,47	1163	1162	0,64
13	<u>borneol</u>	13,687	1168	1169	9,73
14	4-terpineol	14,146	1180	1177	1,5
15	$\alpha$ -terpineol	14,705	1193	1188	5,14
16	<u>verbenona</u>	15,511	1213	1205	2,8
17	<u>n.i.</u>	16,907	1245	-	0,33
18	acetato de <u>bornila</u>	18,738	1288	1285	1,85
19	<u>(E)-cariofileno</u>	24,319	1422	1419	1,39
Total					100,00
Total identificado					99,67
% monoterpenos					98,28
% monoterpenos hidrocarbonetos					11,40
% monoterpenos oxigenados					88,27
% sesquiterpeno					1,39

IK exp.: Índice de Kovats experimental; IK lit.: Índice de Kovats literatura; TR: Tempo de retenção.

Zaouali; Bouzaine; Boussaid (2010) encontraram 25 componentes representando 93,6% de 97,5% do total, onde os majoritários foram 1,8 cineol (40,0%), cânfora (17,9%),  $\alpha$ -pineno (10,3%), e canfeno (6,3%). Os monoterpenos hidrocarbonetos (64%), cetonas constituem (18%). Esses para a espécie analisada em seu estudo. Levando em consideração esses resultados, principalmente a

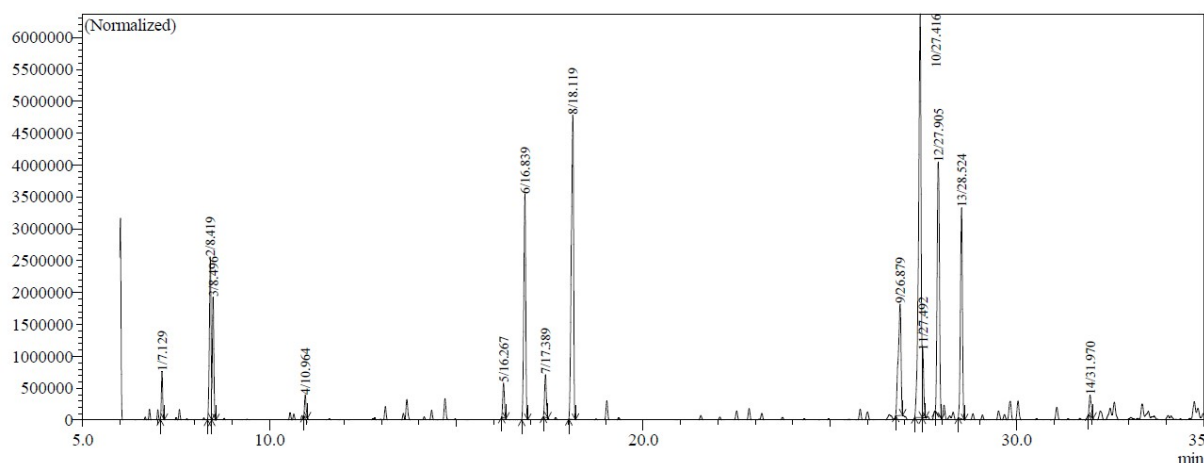


porcentagem do 1,8-cineol, pode-se dizer que há uma relação com o encontrado no presente estudo conforme Tabela 2.

Pesavento et al. (2015) encontraram 99,9% dos componentes do óleo de alecrim. Os componentes mais importantes foram representados por monoterpenos oxigenados (64,6%), sendo o principal 1,8-cineol (43,9%), os monoterpenos hidrocarbonetos totalizaram 25,9%, onde o  $\alpha$ -pineno é o principal e os sesquiterpenos hidrocarbonetos foram de 9,1% e sesquiterpenos oxigenados de apenas 0,3%, o que também condiz ao encontrado no presente estudo.

Na Figura 17 pode-se observar a presença de 12 dos principais sinais entre 5 e 25 minutos de corrida cromatográfica. Na Tabela 3 estão descritos os componentes encontrados do óleo de gengibre, onde verifica-se que 12 compostos identificados, atingindo 97,10% de um total de 100%, sendo que desse identificados 42,93% são monoterpenos (8,25% monoterpenos hidrocarbonetos e 34,68% monoterpenos oxigenados) e por fim uma maior porcentagem de 54,17% são sesquiterpenos hidrocarboneto, neste total encontram-se os compostos majoritários como,  $\alpha$ -zingibereno 24,20%, geraniale 15,71%,  $\beta$ -bisaboleno 12,73%, neral 10,61%,  $\beta$ -sesquifelandreno 10,07%,  $\gamma$ -curcumeno 7,17% e  $\beta$ -felandreno 6,75%.

Figura 17 - Cromatograma do óleo essencial de gengibre



Fonte: Da autora

Tabela 3 - Componentes do óleo de gengibre

Pico	Nome	TR (min.)	IK exp.	IK lit.	%
1	<u>mirceno</u>	7,129	993	990	1,50
2	<u><math>\beta</math>-felandreno</u>	8,419	1030	1029	6,75
3	1,8-cineol	8,496	1032	1031	4,41
4	<u>linalol</u>	10,964	1102	1096	0,76
5	<u>citronelol</u>	16,267	1230	1225	1,40
6	<u>neral</u>	16,839	1244	1238	10,61
7	<u>geraniol</u>	17,389	1257	1252	1,79
8	<u>geranial</u>	18,119	1274	1267	15,71
9	<u><math>\gamma</math>-curcumeno</u>	26,879	1485	1481	7,17
10	<u><math>\alpha</math>-zingibereno</u>	27,416	1499	1493	24,20
11	<u>n.i.</u>	27,492	1500	-	2,00
12	<u><math>\beta</math>-bisaboleno</u>	27,905	1511	1504	12,73
13	<u><math>\beta</math>-sesquifelandreno</u>	28,524	1527	1522	10,07
14	<u>n.i.</u>	31,970	1617	-	0,90
Total					100,00
Total identificado					97,10
% monoterpenos					42,93
% monoterpenos hidrocarbonetos					8,25
% monoterpenos oxigenados					34,68
% sesquiterpenos					54,17

IK exp.: Índice de Kovats experimental; IK lit.: Índice de Kovats literatura; TR: Tempo de retenção.

Koroch et al. (2007) encontraram, ao analisar o óleo essencial de gengibre de uma espécie do Madagascar, 11 componentes que totalizaram 96,6% sendo que os majoritários foram  $\alpha$ -zingibereno 22,9%, Geranial 14,6%,  $\beta$ -bisaboleno 8,5%, Neral 6,4%,  $\beta$ -sesquifelandreno 6,5%,  $\gamma$ -curcumeno 7,7% e  $\beta$ -felandreno 0,9%, pode-se verificar semelhanças com o encontrado no óleo deste experimento.

Nos estudos da composição do óleo de gengibre fresco, An et al. (2016) encontraram zingibereno (22,76%),  $\beta$ -felandreno (12,40%),  $\beta$ -sesquiphellandrene (7,01%), geranial (14,50%),  $\alpha$ -curcumeno (2,78%) e  $\beta$ -bisaboleno (3,25%), o que condiz com os compostos majoritários encontrados no presente estudo.

Algumas diferenças na composição e rendimento dos óleos, normalmente se da em função do local do plantio (tipo de solo), estresse em que a planta foi submetida, método de extração, secagem, período da colheita entre outros.

#### 4.3 Atividade antimicrobiana

Analizou-se a concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente a *E. coli* e ao *S. aureus* com diluições seriadas partindo da concentração de 20 mg/mL até 0,625 mg/mL.

Para a *E. coli* utilizando o extrato aquoso de alecrim verificou-se, (Tabela 4), uma CIM de 5,0 mg/mL e CBM >20 mg/mL, enquanto o extrato aquoso de gengibre uma CIM de 20 mg/mL e CBM >20 mg/mL. Para o óleo essencial de alecrim constatou-se uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL, enquanto o óleo de gengibre uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 5,0 mg/mL.

Tabela 4 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente a *E. coli* do alecrim e do gengibre

Planta	Óleo essencial		Extrato aquoso	
	CIM	CBM	CIM	CBM (mg/mL)
Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	1,25	2,5	5,0	>20
Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	1,25	5,0	20	>20

Para o *S. aureus* utilizando o extrato aquoso de alecrim, obteve-se (Tabela 5), uma CIM e CBM de 5,0 mg/mL, enquanto o extrato aquoso de gengibre uma CIM e CBM de 20 mg/mL. Para o óleo essencial de alecrim constatou-se uma CIM de 0,625 mg/mL e CBM de 1,25 mg/mL, enquanto o óleo de gengibre uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL. A partir destes resultados pode-se dizer que os mesmos demonstram-se promissores em relação a ação bactericida e bacteriostática, tendo como destaque o alecrim, pois este demonstrou-se mais efetivo em sua ação inibitória e bactericida, e também pode-se constatar analisando as Tabelas 4 e 5 que o *S. aureus* apresentou-se mais sensível a ação bactericida dos óleos do que a *E. coli*.

Tabela 5 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente *S. aureus* do alecrim e do gengibre

Planta	Óleo essencial		Extrato aquoso	
	CIM	CBM	CIM	CBM (mg/mL)
Alecrim ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	0,625	1,25	5,0	5,0
Gengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	1,25	2,5	20	20

De acordo com Pesavento et al. (2015), *Rosmarinus* foi mais eficaz contra bactérias Gram-negativas em concentrações mais baixas 25% do que as bactérias Gram-positivas, 50-75% do óleo.

A parede celular bacteriana é uma estrutura complexa, semirrígida, responsável pela forma da célula, circundando a frágil membrana citoplasmática, protegendo-a e ao interior da célula das alterações adversas no ambiente externo. Bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa, constituída de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos que compreende importante fator de evasão da fagocitose e ações do complemento, com caráter hidrofóbico (TORTORA, 2012). Já as bactérias Gram-positivas apresentam externo à membrana citoplasmática, parede celular com presença de ácidos teicóicos, que consistem principalmente de um álcool e fosfato, configurando alta carga negativa, mais propensa a ação por compostos fenólicos dos óleos essenciais.

Segundo Burt (2004) o óleo de alecrim *R. officinalis* possui em sua composição elementos majoritários que exercem ação bactericida, tais como  $\alpha$ -pineno, bornil acetato, cânfora e 1,8 cineol. Sendo que no estudo em questão encontrou-se 1,8-cineol, cânfora, borneol e  $\alpha$ -terpineol.

Alimpic et al. (2015) realizaram a análise de microdiluição em poços, do óleo essencial de *Salvia ringens* frente a alguns microrganismos, sendo que dois deles são os utilizados neste estudo, onde a *E. coli* possui o mesmo (ATCC 25922). A autora testou a atividade antibacteriana do óleo em seis bactérias Gram-negativas e cinco Gram-positivas, e verificou a CIM de 14,25 mg/mL para *E. coli* e 9,5 mg/mL para *S. aureus*. Também constatou que as estirpes Gram-positivas foram mais sensíveis. Ao contrário do acima mencionado, Tzakou et al. (2001) descobriram que os efeitos inibitórios do óleo de *S. ringens* foi mais forte contra bactérias Gram-

negativas e atribuído principalmente à presença de 1,8-cineol como componente majoritário, corroborando assim com o encontrado para alecrim neste estudo.

Tepe et al. (2004) utilizaram o óleo de *S. multicaulis*, utilizando as mesmas cepas do autor anterior, onde encontrou uma MIC para *S. aureus* de 36 mg/mL e 72 mg/mL para *E. coli*.

Celyktas et al. (2007) testaram a capacidade antibacteriana do óleo de alecrim, onde as amostras foram coletadas de três regiões diferentes em quatro épocas do ano, sobre nove microrganismos, sendo que um deles foi *S. aureus* (ATCC 6538P) com resultados encontrados de CIM que variaram de 5,0 mg/mL até 20 mg/mL, e CBM de 10 mg/mL até >20 mg/mL, e um outro microrganismo foi a *E. coli* com resultados de CIM e CBM de 10 mg/mL até >20 mg/mL. No estudo não foi possível relacionar os constituintes majoritários 1,8-cineol (61,4%) e cânfora (24,1%) com a atividade antimicrobiana

Okoh, Sadimenko e Afolayan (2010) estudaram a ação do óleo de alecrim contra *S. aureus* e *E. coli*. O resultado encontrado para a CIM foi de 3,75 e 7,5 mg/mL e CBM de 7,5 e >7,5 mg/mL respectivamente. Os resultados destes experimentos foram bem maiores que os encontrados nas Tabela 4 e 5, provavelmente isso se deve em função do teor de 1,8-cineol, de 11,91% e cânfora 16,57% em comparação com o presente estudo (40,77% e 22,27%) respectivamente.

Os resultados acima não permitem relacionar a atividade antimicrobiana unicamente as quantidades encontradas para os constituintes majoritários. Desta forma estes podem estar relacionados ao efeito sinérgico entre os constituintes.

#### **4.4 Resultados das análises de contagem bacteriana da carne mecanicamente separada (CMS) contaminada adicionada de óleo essencial**

Levando em consideração os resultados obtidos na CIM e CBM para os extratos aquosos de alecrim e gengibre, decidiu-se não utilizar estes na etapa seguinte dos experimentos, devido as quantidades de extrato necessárias para atingir a CBM para os dois microrganismos.

Os resultados obtidos através da metodologia adaptada de Brasil (2003) estão descritos em Unidade Formadora de Colônias por grama (UFC/g), sendo que para *Escherichia coli* o limite do intervalo de precisão e repetibilidade é entre 15 a 150 UFC e para *Staphylococcus aureus* é de 20 a 200 UFC, quando extrapolado estes valores utiliza-se o sinal de < (menor que) ou > (maior que), para identificá-los.

Na Tabela 6, 7, 8 e 9 está descrito as médias das triplicatas dos resultados das análises microbiológicas realizadas com o óleo de alecrim e gengibre, frente a *E. coli* e *S. aureus* respectivamente. Realizou-se estas análises em três concentrações C1 (1 µL/g), C2 (5 µL/g) e C3 (10 µL/g) mais um controle positivo, cada um destes diluiu-se quatro vezes ( $10^6$  até  $10^3$ ), apresentados nas linhas das tabelas. Nas colunas estão representados os quatro tempos de armazenamento das amostras antes de serem analisadas, com intervalo de 24h entre elas perfazendo 72h, sendo T0 (0h), T1 (24h), T2 (48h) e T3 (72h).

De acordo com os resultados das Tabelas 6,7,8 e 9 verificou-se que o óleo de alecrim e gengibre frente as bactérias *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 6538P) não apresentaram efeito bacteriostático e nem bactericida, isso por não apresentar diferença logarítmica entre o controle positivo dos microrganismos e as concentrações realizadas.

O mais provável é que isso está relacionado à concentração do óleo utilizado, isso porque houve crescimento em todas as amostras apenas com a CMS e o microrganismo; e observou-se ação bactericida nos experimentos de CIM.

Essa “alteração” no resultado esperado deve estar relacionada a homogeneização do óleo no meio de cultura em comparação com o CMS, pois o saco de stomaker possui uma área maior do que o poço da placa de microdiluição, dificultando a dispersão do óleo e do microrganismo

Para o controle positivo dos microrganismos verificou-se que houve crescimento bacteriano em todas as placas no decorrer dos experimentos, e para o controle negativo constatou-se que não houve crescimento, garantindo assim a qualidade e a inocuidade dos experimentos realizados.

Tabela 6 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de alecrim frente a *E.coli* em (UFC)

Concentrações	Diluições(UFC)	T0 (0h)	T1 (24h)	T2 (48h)	T3 (72h)
<b>C1 = 1 µl/g</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$3,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$> 1,5 \times 10^6$	$< 1,5 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$
<b>C2 = 5 µl/g</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$3,3 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	0	$3,4 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$
<b>C3 = 10 µl/g</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$< 1,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$> 1,5 \times 10^6$	$< 1,5 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	0	$5,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$
<b>2B (carne + m.o.)</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$4,7 \times 10^5$	$> 1,5 \times 10^6$	$> 1,5 \times 10^6$	$< 1,5 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$

Tabela 7 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de gengibre frente a *E.coli* em (UFC)

Concentrações	Diluições(UFC)	T0 (0h)	T1 (24h)	T2 (48h)	T3 (72h)
<b>C1 = 1 µl/g</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$4,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$> 1,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$
<b>C2 = 5 µl/g</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$3,2 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$
<b>C3 = 10 µl/g</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$5,6 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	$> 1,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$
<b>2B (carne + m.o.)</b>	<b>10<sup>6</sup></b>	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$	$> 1,5 \times 10^8$
	<b>10<sup>5</sup></b>	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$	$> 1,5 \times 10^7$
	<b>10<sup>4</sup></b>	$5,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	$> 1,5 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$
	<b>10<sup>3</sup></b>	$< 1,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4$	$< 1,5 \times 10^4$

Tabela 8 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de alecrim frente ao *S. aureus* em (UFC)

Concentrações	Diluições(UFC)	T0 (0h)	T1 (24h)	T2 (48h)	T3 (72h)
C1 = 1 µl/g	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>6</sup>	8,8 x 10 <sup>5</sup>	5,6 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>
C2 = 5 µl/g	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	8,5 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	4,9 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>
C3 = 10 µl/g	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	7,2 x 10 <sup>5</sup>	4,3 x 10 <sup>5</sup>	5,2 x 10 <sup>5</sup>	5,2 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>
2B (carne + m.o.)	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	9,0 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>

Tabela 9 - Resultados das análises de contagem microbiana do óleo de gengibre frente ao *S. aureus* em (UFC)

Concentrações	Diluições(UFC)	T0 (0h)	T1 (24h)	T2 (48h)	T3 (72h)
C1 = 1 µl/g	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	1,6 x 10 <sup>6</sup>	7,7 x 10 <sup>5</sup>	6,5 x 10 <sup>5</sup>	5,7 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>
C2 = 5 µl/g	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>	3,2 x 10 <sup>5</sup>	6,9 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>
C3 = 10 µl/g	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	8,3 x 10 <sup>5</sup>	7,8 x 10 <sup>5</sup>	4,9 x 10 <sup>5</sup>	5,1 x 10 <sup>5</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>
2B (carne + m.o.)	10 <sup>6</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>	> 2,0 x 10 <sup>8</sup>
	10 <sup>5</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>	> 2,0 x 10 <sup>7</sup>
	10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>	9,3 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>
	10 <sup>3</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>	< 2,0 x 10 <sup>4</sup>



## 5 CONCLUSÃO

Realizou-se neste estudo a obtenção dos extratos de alecrim e gengibre, onde encontrou-se um rendimento de 1,97% e 0,18% para o óleo, respectivamente, e para os extratos aquosos um rendimento de 14,98 e 5,02%, respectivamente. Na identificação dos componentes por cromatografia encontrou-se para o óleo de alecrim, 18 componentes, atingindo 99,67% de um total de 100%, sendo que desse identificados 98,28% são monoterpenos (11,4% monoterpenos hidrocarbonetos e 88,27% monoterpenos oxigenados) e por fim 1,39% são os sesquiterpenos oxigenados, neste total encontram-se os compostos majoritários como, 1,8-cineol (40,77%), cânfora (22,27%), borneol (9,73%) e  $\alpha$ -terpineol (5,14%). Para o gengibre, 12 compostos foram identificados, atingindo 97,10% de um total de 100%, sendo que desse identificados 42,93% são monoterpenos (8,25% monoterpenos hidrocarbonetos e 34,68% monoterpenos oxigenados) e por fim uma grande porcentagem de 54,17% são sesquiterpenos hidrocarboneto, neste total encontram-se os compostos majoritários como,  $\alpha$ -zingibereno 24,20%, geraniale 15,71%,  $\beta$ -bisaboleno 12,73%, neral 10,61%,  $\beta$ -sesquifelandreno 10,07%,  $\gamma$ -curcumeno 7,17% e  $\beta$ -felandreno 6,75%.

Em relação ao estudo realizado da CIM e CBM verificou-se para a *E. coli* utilizando o extrato aquoso de alecrim verificou-se, uma CIM de 5,0 mg/mL e CBM >20 mg/mL, enquanto o extrato aquoso de gengibre uma CIM de 20 mg/mL e CBM >20 mg/mL. Para o óleo essencial de alecrim constatou-se uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL, enquanto o óleo de gengibre uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 5,0 mg/mL. Para o *S. aureus* utilizando o extrato aquoso de alecrim, obteve-se

uma CIM e CBM de 5,0 mg/mL, enquanto o extrato aquoso de gengibre uma CIM e CBM de 20 mg/mL. Para o óleo essencial de alecrim constatou-se uma CIM de 0,625 mg/mL e CBM de 1,25 mg/mL, enquanto o óleo de gengibre uma CIM de 1,25 mg/mL e CBM de 2,5 mg/mL.

Diante dos resultados obtidos na MIC e MBC, pode-se concluir que os óleos essenciais de alecrim e gengibre se apresentam como uma alternativa promissora para aplicação em alimentos a base de CMS, isso como um aditivo natural para estender a vida de prateleira.

Para os resultados das análises de contagem microbiana os óleos essenciais de alecrim e gengibre em um modelo cárneo, CMS de frango, não se mostraram com efeito antibacteriano isso nas concentrações e condições deste experimento.

Por fim pode-se concluir que são necessários mais testes microbiológicos para avaliar as concentrações a serem utilizadas, com atividade antimicrobiana em um modelo cárneo.

## REFERÊNCIAS

- ABE, S.; SATO, Y.; INOUE, S.; ISHIBASHI, H.; MARUYAMA, N.; TAKIZAWA, T.; OSHIMA, H.; YAMAGUCHI, H. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 44, n. 4, p. 285-291, 2003.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, v. 456 p.2001.
- ALIMPIĆ, A.; PLJEVLJAKUŠIĆ, D.; ŠAVIKIN, K.; KNEŽEVIĆ, A.; ĆURČIĆ, M.; VELIČKOVIĆ, D.; STEVIĆ, T.; PETROVIĆ, G.; MATEVSKI, V.; VUKOJEVIĆ, J.; MARKOVIĆ, S.; MARIN, P.T.; DULETIĆ-LAUŠEVIĆA, S. Composition and biological effects of *Salvia ringens*(Lamiaceae) essential oil and extracts. **Industrial Crops and Products** v. 76 p. 702–709, 2015.
- ALSALME, A.; KOZHEVNIKOVA, E. F.; KOZHEVNIKOV, I.V.  $\alpha$ -Pinene isomerisation over heteropoly acid catalysts in the gas-phase. **Applied Catalysis A : General**. p. 219-224, 2010.
- AHMED, S. A.; JABBAR, I.I.; ABDUL, H.E.; MUSTANSIRIYA, A.L.. Study the antibacterial activity of *Zingiber officinale* roots against some of pathogenic bacteria. **Al-Mustansiriya Journal Science**, v.23, n.3, p.63-70, 2012.
- AN, K; ZHAO, D.; WANG, Z.; WU, J.; XU, Y.; XIAO, G. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. **Food Chemistry**. V. 197, P.1292–1300, 2016.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M DAS G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciências Agronômicas**., Fortaleza, v. 43, n. 2, jun 2012.

ANTONIOUS, G. F.; KOCHHAR, T.S. Zingiberene and curcumene in wild tomato. **Environ Science Health**. v. 38, p. 489-500. 2003.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, v. 62(1) p. 55- 61, 2003.

BAKKALI, F; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemistry and Toxicology**. v. 46, p. 446-475, 2008.

BARRETO, H. M.; FILHO, E. C. Silva; LIMB, E. de O.; COUTINHO, H. D.M.; BRAGA, M. F.B. M.; TAVARES, C. C. A.; TINTINO, S. R.; REGO, J. V.; ABREU, A. P.L. de; LUSTOSA, M. do C. G.; OLIVEIRA, R. W. G.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotictherapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and products**. v.59 p. 290-294, 2014.

BENTLEY, F.K.; GARCIA, C.; CHEM, J. G.; MELIS, H. C. A. Paradigm of Monoterpene ( $\beta$ -phellandrene) Hydrocarbons Production via Photosynthesis in Cyanobacteria. **BioEnergy**. v. 6, p. 917–929, 2013.

BHATIA, S. P.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on borneol **Food and Chemical Toxicology** v. 46, p. 77–80, 2008.

BODNER, J. M., SIEG, J. Ingredients in meat products. **Fiber. In R. Tarté**, p. 83–109, 2009.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v. 62(3), p. 381 a 390, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004**. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Brasília, DF, n. 6, p. 1, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: **Aditivos Alimentares Definições, Classificação e Emprego**. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de outubro de 1997.  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/POR\\_TARIA\\_540\\_1997.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/POR_TARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES), Acesso em 28 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC-276, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília (DF): 2005.Disponível em:

[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c8b2040047457a8c873cd73fbc4c6735/RDC\\_276\\_2005.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c8b2040047457a8c873cd73fbc4c6735/RDC_276_2005.pdf?MOD=AJPERES), Acesso em 28 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 4, de 31 de março de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de CMS**. Brasília, 2000. Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%2004.htm>, Acesso em 27 set. 2014.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2003. Seção 1. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>, Acesso em 29 set. 2014.

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007. **Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94(3), p. 223 a 253, 2004.

CALO, J. R.; GRANDALL, P. G.; O" BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**. v. 54, p. 111-119, 2015.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9- 14, 2002.

CARVALHO, A. C. de F. B. De; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella spp.* em carcaças, carne mecanicamente separada, linguças e cortes comerciais de frango. **Ciência. Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.

CEBORSKA, M.; SZWED, K.; ASZTEMBORSKA, M.; RYLIK, M. W.; KICINSKA, E.; SUWINSKA, K. Study of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes with volatile molecules geraniol and  $\alpha$ -terpineol enantiomers in solid state and in solution. **Chemical Physics Letters**. v. 641, p. 44-50. 2015.

CELIKEL, N., KAVAS, G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. **Journal Food Science**. v. 26, p. 174–181, 2008.

CELYKTAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, 100, 553–559, 2007.

COSTA, C. D. R. S. **Importância de *Staphylococcus Spp.* Produtores de Enterotoxinas em Alimentos**. 2008. Monografia apresentada ao programa de Pós graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, BH, 2008.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil from *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 88, p. 170–175, 2000.

DAROS, F. G.; MASSON, M. L.; AMICO, S. C. The influence of the addition of mechanically deboned poultry meat on the rheological properties of sausage. **Journal of Food Engineering**, v. 68 p. 185–189, 2005.

DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 6(4), p. 486-510, 2011.

ELPO, E. R. S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade**. 2004. Tese Doutorado em Agronomia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

**Farmacopéia Brasileira**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988-2005.

FILHO, H. H.; PICCOLI, R. H. Efeito do óleo essencial de gengibre sobre o crescimento e indução de tolerância em *Listeria monocytogenes*. **XXII Congresso de Pós-graduação da UFLA**, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**.V. 5 n.1, 2012.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 2003.

HAIDA, K. S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de ciências da saúde da UNIPAR**, v.11, n.3, p.185-92, 2007.

HO, C. L.; JIE-PINGE, O.; LIU, Y. C.; HUNG, C. P.; TSAI, M. C.; LIAO, P. C. ; WANG, E. I.; CHEN, Y. L.; SU, Y. C. Compositions and in vitro anticancer activities of the leaf and fruit oils of *Litsea cubeba* from Taiwan. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 617–620, 2010.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. A review. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.22, p. 273–292, 2005.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers Microbiology**, v.3, p.1–12, 2012.

JAYASENA, D. D.; JO, C., Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. **Trend in Science e Technology**, v.34, p.96-108, 2013.

JORDÁN, M. J.; LAX, V.; ROTA M. C.; LORÁN S.; SOTOMAYOR, J. A., Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L.. **Food Control**, v.30 p. 463 a 468, 2013.

KOROCH, A.; RANARIVELO, L.; BEHRA, O.; JULIANI, H. R.; SIMON, J. E. Quality Attributes of Ginger end Cinamon Essential Oils from Madagascar. **Botanical and Medicinals**. Janick and A Whipkey ed. ASHS Press, Alexandria, 2007.

KUMAR, M.; ANDO, Y. Carbon nanotubes from canphor: An environment friendly nanotechnology. **Journal of Physics: Conference Series**, 2007.

LEITE, A. M. O.; FRANCO, R.M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.13, p.80-83, 2006.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v.26, p.170-178, 2005.

LÓPEZ et. al, Analysis of essential oils from chemotypes of *Thymus vulgaris* in Catalonia, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.87, p.2327-2333, 2007.

LUNESTAD, B. T.; FRANTZEN, S. ; SVANEVIK, C. S.; ROIHA, I. S.; DUINKER,A. Time trends in the prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007-2012. **Food Control**. v. 60, p.289-295, 2016.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. de F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos**. Embrapa Agroindustrial Tropical, 2011, v. 2179-8184, n. 145, p. 31.

MARIUTTI, L. R. B.; NOGUEIRA, G. C.; BRAGAGNOLO, N. Lipid and cholesterol oxidation in chicken meat are inhibited by sage but not by garlic. **Journal of Food Science**, v.76(6) p. 909-915, 2011.

MARTIN, D; VALDEZ, J; BOREN, J; MAVERSOH, M. Dermal absorption of camphor, menthol, and methyl salicylate in humans. **Journal of Clinical Pharmacology** v. 44 p. 1151–7, 2004.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 2007.

MESOMO, M. C.; CORAZZA, M. L.; NDIAYE, P. M.; DALLA SANTA, O, R.; CARDOZO, L.; SCHEER, A. DE P. Supercritical CO<sub>2</sub> extracts and essential oil of

ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 80, p. 44-49, 2013.

MOGRICH, A.; HWANG, S. W.; EARLEY, T. J.; PETRUS, M. J.; MURRAY, A. N.; SPENCER, K. S. R.; ANDAHAZY, M.; STORY, G. M.; PATAPOUTIAN, A. Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin. **Science** **307**, p.1468–72, 2005.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control** v.13, p. 289–292, 2002.

NAPOLI, E. M. G.; CURCURUTO, G.; RUBERTO, G. Screening of the essential oil composition of wild *Sicilian rosemary*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 38, p. 659-670, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. Ed. Porto Alegre. Artemed, 2011.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. NCCLS document M7-A6. v.32, n.2, 2003. Disponível em: <[http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi\\_OPASM7\\_A6.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/biblioteca/clsi_OPASM7_A6.pdf)>. Acesso em: 02 jan. 2015.

NYCHAS, G. J. E.; SKANDAMIS, P. N. Antimicrobials from herbs and spices. **Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods**. 2003.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v.120, p. 308–312, 2010.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. das G.; ABREU, L. R. de; MORAIS, A. R. de; GUIMARÃES, L. G. de L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 03, p. 887-893, 2008.

PEREIRA, A. G. T.; RAMOS, E. M.; TEIXEIRA, J. T.; CARDOSO, G. P.; RAMOS, A. de L. S.; FONTES, P. R. Effects of the addition of mechanically deboned poultry meat and collagen fibers on quality characteristics of frankfurter-type sausages. **Meat Science**, v. 89 p. 519-525, 2011.

PEREIRA, B. R.C.; SILVA, A.J.R.; BARBOSA, A.L.S.; SABAA-SRUR, A.U.O. Obtenção de óleo essencial e oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por arraste com vapor e extração com solvente. **Revista Universitária Rural Ser Companhia da Vida**. v. 27, n. 1. 2007.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A.R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA, R.; MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; DI MARTINO, M.C.; LO NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, *Rosmarinus* and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**. v. 54, p. 188-199, 2015.



RASOOLI, I.; FAKOOR, M. H.; YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; ALLAMEHII, A.; REZAEI, M. B. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 135-139, 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; J. **Medicinal plants and antimicrobial activity**. *Ethnopharmacology*, v. 100, p. 80 – 84, 2005.

ROCHA, B. C. A. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)**. Dissertação Mestrado em Ciência. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SACCHETTI, G. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Italy, v. 91, n. 03, p. 621-632, 2004.

SANGADKIT, W.; RATTANABUMRUNG, O.; SUPANIVATIN, P.; THIPAYARAT, A. Practical coliforms and *Escherichia coli* detection and enumeration for industrial food samples using low-cost digital microscopy. **Procedia Engineering**. v. 32, p. 126-133, 2012.

SA-NGUANPUAG, K.; KANLAYANARAT, S.; SRILAONG, V.; TANPRASERT, K.; TECHAVUTHIPORN, C. Ginger (*Zingiber officinale*) oil as an antimicrobial agent for minimally processed produce: a case study in shredded green papaya. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.13, n. 6, p.895-901, 2011.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Food Protein**. v. 68, p. 790-795, 2005.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and Antinociceptive Effects of 1,8-Cineole a Terpenoid Oxide Present in many Plant Essential Oils. **PHYTOTHERAPY RESEARCH Phytother**. v.14, p. 240–244, 2000.

SHAO, S.; ZHOU, T.; TSAO, R. Antimicrobials from plants – food preservation and shelf-life extension. in MOO-YOUNG, M.(Ed.). **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, University of Waterloo, Canada. v.4, p.645–58, 2011.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5 ed Florianópolis: Ed. UFRGS: 2004, p 821.

SINGH, G.; MAURY, S.; DELAMPASONA, M, P.; CATALAN, C. A. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and chemical Toxicology**, v. 45, p. 1650-1661, 2007.

SKOČKOVÁ, A.; KOLÁČKOVÁ, I.; BOGDANOVIČOVÁ, K.; KARPÍŠKOVÁ, R. Characteristic and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from retail meats purchased in the Czech Republic. **Food Control**. v. 47, p. 401-406, 2015.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista At Prim Saúde**. v. 9, p.83-88, 2006.

SOUZA, E. L.; SILVA, C. A.; SOUSA, C. P. de. Bacteriocins: molecules of fundamental impact on the microbial ecology and potential food biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, p. 559-566, 2005.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. v.21, p.1199-1218, 2010.

TAN, S. L.; LEE, H. Y.; MAHYUDIN, A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. **Food Control**.v.44 p. 203 e 207, 2014.

TANG, B.; FANG, G.; GAO, Y.; LIU, Y.; LIU, J.; ZOU, M.; WANG, L.; CHENG, G. Lipid-albumin nanoassemblies co-loaded with borneol and paclitaxel for intracellular drug delivery to C6 glioma cells with P gp inhibition and its tumor targeting. **Asian journal of pharmaceutical sciences** v.10, p.363–371, 2015.

TEPE, B.; DONMEZ, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; VARDAR-UNLU, G.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A., Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**. v. 84, p.519–525. 2004.

TIWARI, B.; VALDRAMIDIS, V. V.; O' DONNELL, C. P.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; CULLEN, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p.5987-6000, 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Procarotos: Domínios Bactéria e Archaea**. Microbiologia, Porto Alegre: Artemed, v.8, p. 305-303, 2005.

TZAKOU, O.; PITAROKILI, D.; CHINOU, I. B.; HARVALA, C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. **Planta Medicinal.**, v.67, p. 81-83, 2001.

UÇAR, E.; TEKSÖZ, S.; İÇHEDEF, Ç.; KILÇAR, A. Y.; ÜNAK, P. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the biodistribution of <sup>99m</sup>Tc sulphur colloid and on the radiolabeled blood constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, p. 182-185, 2013.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p. 463-471, 1963.

WANG, W.; LI, N.; LUO, M.; YUANGANG, Z.; EFFERTH, T. Antimicrobacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**. v. 17, p. 2704–2713, 2012.

WHO: **Food safety and foodborne illness**. World Health Organization Fact sheet 237, Geneva, revised January 2002. A

WHO: **World health report 2002: Reducing risks, promoting healthy life**, World Health Organization, Geneva: 30 October, 1020-3311, p. 248. : 2002. B

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 01, p. 3-19, 2003.

XIANG, J.; LIU, F.; FAN, R.; GAO, Y. Physicochemical stability of citral emulsions stabilized by milk proteins (lactoferrin, -lactalbumin, -lactoglobulin) and beet pectin. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 487, p. 104–112, 2015.

YEHB, H-Y.; CHUANGB, C-H.; CHENC, H-C.; WAND, C-J.; CHENA, T-L.; LINA, L-Y. Bioactive componentes analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. **Food Science and Technology**. v. 55, p. 329-334, 2014.

YOUSUFI, M. K. To Study Antiacterial Activity of *Allium Sativum*, *Zingiber officinale* and *Allium Cepa* by Kirby-Bauer Method. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**. v.4, n.5, p.6-8, 2012.

ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.

ZAOUALI, Y.; BOUZAIN, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**. v.48, p. 3144–3152, 2010.